

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 5 月 13 日 (13.05.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/039405 A1

(51) 国際特許分類: A61K 45/00, 31/7088, 38/17, 48/00, A61P 3/04, 3/06, 3/10, G01N 33/566, 33/50, 33/15 // C12N 15/12, C12Q 1/02, 1/68, C07K 14/47, 16/18

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/013782

(22) 国際出願日: 2003 年 10 月 28 日 (28.10.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2002-314041 2002 年 10 月 29 日 (29.10.2002) JP
特願 2003-156306 2003 年 6 月 2 日 (02.06.2003) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府 大阪市中央区 道修町四丁目 1 番 1 号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 岩本 圭司 (IWAMOTO, Keiji) [JP/JP]; 〒563-0029 大阪府 池田市 五月丘 5 丁目 1-3-306 Osaka (JP). 片山 望 (KATAYAMA, Nozomi) [JP/JP]; 〒305-0821 茨城県 つくば市 春日 1 丁目 7-9-801 Ibaraki (JP). 河村 美

穂子 (KAWAMURA, Mihoko) [JP/JP]; 〒305-0035 茨城県 つくば市 松代 3 丁目 12-1-612 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 高橋 秀一, 外 (TAKAHASHI, Shuichi et al.); 〒532-0024 大阪府 大阪市淀川区 十三本町 2 丁目 17 番 85 号 武田薬品工業株式会社大阪工場内 Osaka (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: USE OF SGLT HOMOLOG

(54) 発明の名称: SGLT ホモログ用途

(57) Abstract: It is intended to provide an agent inhibiting or promoting glucose uptake in the small intestine, etc. which contains a compound inhibiting or promoting the activity of an Na⁺/glucose transporter (SGLT) homolog or its salt.

(57) 要約: 本発明は、Na⁺/グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログの活性を阻害または促進する化合物またはその塩を含有してなる小腸でのグルコース取り込み阻害または促進剤などを提供する。

WO 2004/039405 A1

明細書

SGLTホモログ用途

5 技術分野

本発明は、Na⁺/グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログの活性または該ホモログの遺伝子の発現を調節 (阻害または促進) する化合物またはその塩を含有してなる小腸でのグルコース取り込み調節 (阻害または促進) 剤、該ホモログを用いることを特徴とする、該ホモログの小腸でのグルコース取り込み活性を調節する化合物またはその塩のスクリーニング方法、そのスクリーニング方法によって得られうる化合物またはその塩、その化合物または塩を含有する医薬などに関する。

背景技術

15 グルコースが細胞内外を移行するには、細胞膜上に糖輸送担体と呼ばれる膜蛋白質が必要である。

グルコースの輸送担体は、受動輸送担体である促進拡散型グルコーストランスポーター (GLUT) と Na⁺イオン輸送と共役することでグルコースを濃度勾配に逆ら
20 って輸送する能動輸送担体である Na⁺/グルコーストランスポーター (SGLT) に大別される。GLUT は、8種類のアイソフォームが存在し、分子量約5万の細胞膜を12回貫通する共通構造を有している。

SGLT は、分子量7.5万の細胞膜を14回貫通する共通構造を有している。

日本臨床 55, 1997、増刊号、糖尿病 I、59-64 には SGLT1 および 2 の機能や発現部位が概説されている。

25 ヒト SGLT1 は、小腸、腎臓に特異的に発現しグルコースに対して高親和性で輸送能は小さく、ヒト SGLT2 は、腎臓特異的に発現しグルコースに対して低親和性で輸送能は大きい事が知られている。SGLT は、グルコースの小腸からの吸収と、腎臓から一旦尿中に排出されたグルコースを再吸収する役割を担っている。

また、SGLT ホモログは、WO 02/53738 に開示された蛋白質であり、肝

臓で発現しており、これを賦活化することで糖新生を抑制し空腹時高血糖を是正する糖尿病治療薬となると考えられる。

一方、糖尿病における食後高血糖（食後過血糖）は、食事摂取後の血糖値の上昇に対応したインスリン分泌の低下と肝臓・筋肉におけるインスリン抵抗性が加わって生じる。食後高血糖を是正する手段として α -グルコシダーゼ阻害薬がある。 α -グルコシダーゼ阻害薬は、多糖類から単糖への消化を抑制することで、腸管から糖を吸収する速度を遅延する。しかし、食事時のグルコースの吸収は抑制できないため、長期的な血糖値の指標である HbA1c 値の低下効果は低い。また、小腸内に未分解で残るスクロースやマルトースにより、水溶性下痢、腹部膨満感などの副作用を生じることがある。

発明の開示

小腸で主に糖の吸収の役割を担っていると考えられている SGLT1 を阻害すれば、食事時のグルコースの吸収を抑制し、 α -グルコシダーゼ阻害薬よりも強力に食後高血糖を是正することが期待できる。また、二糖類に比べて単糖のグルコースは水分貯留が軽度であるため、消化管症状の副作用も軽減できることが期待される。

しかしながら、SGLT の阻害剤であるフロリジンおよびその誘導体は、ラットにおいて、SGLT を阻害することで、腎臓におけるグルコースの再吸収を抑制し、尿中にグルコースを排出することで血糖値を降下させる作用が示されている (Diabetes 48:1794-1800, 1999) が、腸管からの糖の吸収抑制作用は弱いことが報告されている (Journal of Medicinal Chemistry 42: 5311-5324, 1999)。

これは、小腸においてフロリジンに耐性が強い別の SGLT が存在するためと考えられる (Am J Physiol 256 : G618-G623, 1989, Am J Physiol 270 : G833-G843, 1996) が、その実体は現在まで明らかでない。フロリジン耐性の SGLT の実体を明らかにし、SGLT 阻害作用を応用した腸管からの糖の吸収抑制作用を有する化合物のスクリーニング方法、該スクリーニング方法によって得られうる化合物を提供することが課題である。

従って、小腸でのグルコース取り込みを特異的に調節（阻害または促進）する薬剤の開発が待たれているのが現状である。

本発明者らは、上記課題を解決すること目的とし、Gene Logic データベースを検索した結果、 Na^+ /グルコーストランスポーター蛋白質であるヒト SGLT ホモログが、ヒト SGLT1 の約二倍、小腸において発現していることを見出した。かかる知見に基づき、さらに研究を進めた結果、SGLT ホモログが、小腸におけるグルコースの吸収に重要な輸送担体であることを突き止め、さらに、これを阻害することは、食後血糖の上昇を抑制する糖尿病治療薬として有効であり、これを促進することは、グルコースの吸収を促進する低血糖治療薬、胃腸薬として有効であると考え、検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、

- 10 (1) Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログの活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなる小腸でのグルコース取り込み阻害剤；
- (2) Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログの遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩を含有してなる小腸でのグルコース取り込み阻害剤；
- (3) 食後過血糖改善剤である前記 (1) または (2) 記載の剤；
- 15 (4) 糖尿病または高脂血症予防・治療剤である前記 (1) ないし (3) 記載の剤；
- (5) Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログの活性を促進する化合物またはその塩を含有してなる小腸でのグルコース取り込み促進剤；
- (6) Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログの遺伝子の発現を促進
- 20 する化合物またはその塩を含有してなる小腸でのグルコース取り込み促進剤；
- (7) グルコースの吸収促進剤である前記 (5) または (6) 記載の剤；
- (8) Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログが配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩である前記 (1) ないし (7) 記載
- 25 の剤；
- (9) Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログが配列番号：3 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩である前記 (1) ないし (7) 記載の剤；

(10) Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログが配列番号：5または配列番号：50で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩である前記(1)ないし(7)記載の剤；

5 (11) Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログをコードするポリヌクレオチドの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部分を含有するアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる小腸でのグルコース取り込み阻害剤；

(12) 食後過血糖改善剤である前記(11)記載の剤；

10 (13) 糖尿病または高脂血症の予防・治療剤である前記(11)または(12)記載の剤；

(14) Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログをコードするポリヌクレオチドが配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6または配列番号：51で表される塩基配列と同一もしくは実質的に同一の塩基配列を含有するポリヌクレオチドである前記(11)ないし(13)記載の剤；

15

(15) Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログに対する抗体を含有してなる小腸でのグルコース取り込み阻害剤；

(16) 食後過血糖改善剤である前記(15)記載の剤；

(17) 糖尿病または高脂血症予防・治療剤である前記(15)または(16)記載の剤；

20

(18) Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログが配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5または配列番号：50で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩である前記(15)ないし(17)記載の剤；

25 (19) Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログに対する抗体を含有してなる食後過血糖の診断薬；

(20) Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログをコードするポリヌクレオチドを含有してなる食後過血糖の診断薬；

(21) Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログを用いることを特徴

とする、該ホモログの小腸でのグルコース取り込み活性を調節する化合物またはその塩のスクリーニング方法；

(22) Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログが配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5または配列番号：50で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩である前記(21)記載のスクリーニング方法；

(23) Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログを含有することを特徴とする、該ホモログの小腸でのグルコース取り込み活性を調節する化合物またはその塩のスクリーニング用キット；

10 (24) 前記(21)もしくは(22)記載のスクリーニング方法または前記(23)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる化合物またはその塩；

(25) 前記(24)記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬；

(26) 食後過血糖改善剤である前記(25)記載の医薬；

(27) 糖尿病または高脂血症予防・治療剤である前記(25)または(26)

15 記載の医薬；

(28) Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログをコードするポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、該ホモログの小腸でのグルコース取り込み活性を調節する化合物またはその塩のスクリーニング方法；

20 (29) Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログをコードするポリヌクレオチドが配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6または配列番号：51で表される塩基配列と同一もしくは実質的に同一の塩基配列を含有するポリヌクレオチドである前記(28)記載のスクリーニング方法；

25 (30) Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログをコードするポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、該ホモログの小腸でのグルコース取り込み活性を調節する化合物またはその塩のスクリーニング用キット；

(31) 前記(28)もしくは(29)記載のスクリーニング方法または前記(30)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる化合物またはその塩；

(32) 前記(31)記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬；

(33) 食後過血糖改善剤である前記(32)記載の医薬；

(34) 糖尿病または高脂血症予防・治療剤である前記(32)または(33)記載の医薬；

(35) Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログの活性を阻害することとを特徴とする小腸でのグルコース取り込み阻害方法；

- 5 (36) Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログの遺伝子の発現を阻害することとを特徴とする小腸でのグルコース取り込み阻害方法；

(37) 食後過血糖改善方法である前記(35)または(36)記載の方法；

(38) 糖尿病または高脂血症予防・治療方法である前記(35)ないし(37)記載の方法；

- 10 (39) Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログの活性を促進することとを特徴とする小腸でのグルコース取り込み促進方法；

(40) Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログの遺伝子の発現を促進することとを特徴とする小腸でのグルコース取り込み促進方法；

- 15 (41) グルコースの吸収促進方法である前記(39)または(40)記載の方法；

(42) Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログの活性を阻害する化合物またはその塩の有効量を哺乳動物に投与することとを特徴とする小腸でのグルコース取り込み阻害方法；

- 20 (43) Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログの遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩の有効量を哺乳動物に投与することとを特徴とする小腸でのグルコース取り込み阻害方法；

(44) 食後過血糖改善方法である前記(42)または(43)記載の方法；

(45) 糖尿病または高脂血症予防・治療方法である前記(42)ないし(44)記載の方法；

- 25 (46) Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログの活性を促進する化合物またはその塩の有効量を哺乳動物に投与することとを特徴とする小腸でのグルコース取り込み促進方法；

(47) Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログの遺伝子の発現を促進する化合物またはその塩の有効量を哺乳動物に投与することとを特徴とする小腸

でのグルコース取り込み促進方法；

(48) グルコースの吸収促進方法である前記(46)または(47)記載の方法；

5 (49) 小腸でのグルコース取り込み阻害剤の製造のための Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログの活性を阻害する化合物またはその塩の使用；

(50) 小腸でのグルコース取り込み阻害剤の製造のための Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログの活性を阻害する化合物またはその塩の使用；

(51) 小腸でのグルコース取り込み阻害剤が食後過血糖改善剤である前記(49)または(50)記載の使用；

10 (52) 小腸でのグルコース取り込み阻害剤が糖尿病または高脂血症予防・治療剤である前記(49)ないし(51)記載の使用；

(53) 小腸でのグルコース取り込み促進剤の製造のための Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログの活性を促進する化合物またはその塩の使用；

15 (54) 小腸でのグルコース取り込み促進剤の製造のための Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログの活性を促進する化合物またはその塩の使用；

(55) 小腸でのグルコース取り込み促進剤がグルコースの吸収促進剤である前記(53)または(54)記載の使用；などに関する。

図面の簡単な説明

20 図1は、実施例2で得られた、消化管におけるヒトSGLTホモログの発現分布のグラフを示す図面である。

図2は、実施例3で得られた、初代培養正常ヒト小腸上皮細胞におけるSGLT1, SGLTホモログの発現解析結果のグラフを示す図面である。

25 図3は、実施例4で得られた、抗ヒトSGLTホモログ抗体によるヒト小腸切片の免疫染色結果の写真を示す図面である。

図4は、実施例5で得られた、糖尿病マウスにおけるSGLTホモログの発現変動の結果のグラフを示す図面である。

図5は、実施例5で得られた、糖尿病ラットにおけるSGLTホモログの発現変動の結果のグラフを示す図面である。

図6は、実施例6で得られた、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、サルの小腸におけるSGLT1, SGLTホモログの発現量をRT-PCR法で比較した結果の写真を示す図面である。

図7は、実施例7で得られた、マウス、ラット、ハムスター小腸器官培養系による糖取り込み量の測定結果のグラフを示す図面である。

発明を実施するための最良の形態

本発明で用いられる Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログ (以下、本発明のタンパク質または本発明で用いられるタンパク質と称することもある) としては、例えば、WO 02/53738に開示されたSGLTホモログ、WO 01/75067に開示されたSGLTホモログ、WO 01/92304に開示されたSGLTホモログ (TRICH)、WO 02/4520に開示されたSGLTホモログ (TRICH)、WO 02/10216に開示されたSGLTホモログなどが挙げられるが、なかでも、WO 02/53738に開示されたSGLTホモログが好ましく、とりわけ、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5または配列番号：50で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質が好ましく用いられる。

Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログは、ヒトや温血動物 (例えば、モルモット、ハムスター、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど) の細胞 (例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓 β 細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、杯細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞 (例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など) もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位 (例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳)、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管 (例、大

腸、小腸)、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋などに由来するタンパク質であってもよく、合成タンパク質であってもよい。

本明細書において、「実質的に同一のアミノ酸配列」とは、比較するアミノ酸配列に対して、例えば、約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列をいう。アミノ酸配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件(期待値=10;ギャップを許す;マトリクス=BLOSUM62;フィルタリング=OFF)にて計算することができる。

例えば、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

実質的に同質の活性としては、例えば、グルコースの能動輸送活性などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの性質が性質的に(例、生理学的に、または薬理学的に)同質であることを示す。したがって、グルコースの能動輸送活性が同等(例、約0.01~100倍、好ましくは約0.1~10倍、より好ましくは0.5~2倍)であることが好ましいが、これらの活性の程度、タンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

グルコースの能動輸送活性などの活性の測定は、公知の方法に準じて行うことができるが、例えば、Cloning and functional expression of an SGLT-1-like protein from the *Xenopus laevis* intestine (Am. J. Physiol. 276: G1251-G1259, 1999)に記載の方法またはそれに準じる方法に従って測定することができる。

また、本発明で用いられるタンパク質としては、例えば、(i)配列番号:1で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上(例えば1~100個程度、好ましくは1~30個程度、好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数(1~5))

個) のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(ii) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列に1または2個以上(例えば1～100個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数(1～5)個) のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(iii) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列に1または2
5 個以上(例えば1～100個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数(1～5)個) のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(iv) 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上(例えば1～100個程度、好ましくは1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数(1～5)個) のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミ
10 ノ酸配列、または(v) それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテインも含まれる。

上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、欠失または置換の位置としては、とくに限定されない。

本発明で用いられるタンパク質は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端
15 (アミノ末端)、右端がC末端(カルボキシル末端)である。配列番号：1 で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をはじめとする、本発明で用いられるタンパク質は、C末端がカルボキシル基($-\text{COOH}$)、カルボキシレート($-\text{COO}^-$)、アミド($-\text{CONH}_2$)またはエステル($-\text{COOR}$)の何れであってもよい。

20 ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチルなどの C_{1-6} アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-8} シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -ナフチルなどの C_{6-12} アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- C_{1-2} アルキル基もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル- C_{1-2} アルキル基などの C_{7-14} アラルキル基、ピパロイルオキシメチル基などが用いられる。
25

本発明で用いられるタンパク質がC末端以外にカルボキシル基(またはカルボキシレート)を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明で用いられるタンパク質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明で用いられるタンパク質には、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁₋₆アルカノイルなどのC₁₋₆アシル基など）で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁₋₆アルカノイル基などのC₁₋₆アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

- 10 本発明で用いられるタンパク質の具体例としては、例えば、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するヒト由来のタンパク質などがあげられる。

本発明のタンパク質の部分ペプチドとしては、前記した本発明のタンパク質の部分ペプチドであって、好ましくは、前記した本発明のタンパク質と同様の性質を有するものであればいずれのものでもよい。

- 15 本発明のタンパク質が構成するアミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、さらに好ましくは70個以上、より好ましくは100個以上、最も好ましくは200個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが用いられる。

- また、本発明で用いられる部分ペプチドは、そのアミノ酸配列中の1または2
20 個以上（好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数
25 （1～5）個）のアミノ酸が挿入され、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、より好ましくは数個、さらに好ましくは1～5個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

本発明の部分ペプチドとしては、配列番号：1で表されるアミノ酸配列において例えば第176番目～201番目、第471番目～491番目のアミノ酸配列を含有するペ

プチドが好ましい。配列番号：3で表されるアミノ酸配列において例えば第172番目～197番目、第467番目～487番目のアミノ酸配列を含有するペプチドが好ましい。

配列番号：5で表されるアミノ酸配列において例えば第175番目～200番目、第470番目～490番目のアミノ酸配列を含有するペプチドが好ましい。配列番号：50で

- 5 表されるアミノ酸配列において例えば第176番目～201番目、第471番目～491番目のアミノ酸配列を含有するペプチドが好ましい。

また、本発明で用いられる部分ペプチドはC末端がカルボキシル基 ($-COOH$)、カルボキシレート ($-COO^-$)、アミド ($-CONH_2$) またはエステル ($-COOR$) の何れであってもよい。

- 10 さらに、本発明で用いられる部分ペプチドには、前記した本発明で用いられるタンパク質と同様に、C末端以外にカルボキシル基 (またはカルボキシレート) を有しているもの、N末端のアミノ酸残基 (例、メチオニン残基) のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な
- 15 保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

本発明で用いられる部分ペプチドは抗体作成のための抗原としても用いることができる。

- たとえば、後述する本発明の抗体を調製する目的には、例えば配列番号：1で
- 20 表されるアミノ酸配列において第261～275番目、第399～417番目、第500～649番目のアミノ酸配列を含有するペプチドなどがあげられる。配列番号：3で表されるアミノ酸配列において第257～271番目、第395～413番目、第496～645番目のアミノ酸配列を含有するペプチドなどがあげられる。配列番号：5で表されるアミノ酸配列において第260～274番目、第398～416番目、第499～648番目のアミノ酸
- 25 配列を含有するペプチドなどがあげられる。配列番号：50で表されるアミノ酸配列において第261～275番目、第399～417番目、第500～649番目のアミノ酸配列を含有するペプチドなどがあげられる。

本発明で用いられるタンパク質または部分ペプチドの塩としては、生理学的に許容される酸 (例、無機酸、有機酸) や塩基 (例、アルカリ金属塩) などとの塩

が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明で用いられるタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩は、前述したヒトや温血動物の細胞または組織から自体公知のタンパク質の精製方法によって製造することもできるし、タンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩、またはそのアミド体の合成には、通常市販のタンパク質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするタンパク質の配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からタンパク質または部分ペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはそれらのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、タンパク質合成に使用できる各種活

性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBT, HOOBT）

- 5 とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOOBTエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

- 保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、タンパク質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、
- 10 N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸
- 15 エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はタンパク質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃～50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行なうことなく縮合反応を
- 20 繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることができる。

- 原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、t-ペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。
- 25

カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、

プロピル、ブチル、*t*-ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプ
チル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状ア
ルキルエステル化)、アラルキルエステル化 (例えば、ベンジルエステル、4-ニ
トロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエ
5 ステル、ベンズヒドリルエステル化)、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカ
ルボニルヒドラジド化、*t*-ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラ
ジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護するこ
とができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低
10 級 (C_{1-6}) アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシ
カルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いら
れる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒド
ロピラニル基、*t*-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、 Bz 、 Cl_2 -
15 Bz 、2-ニトロベンジル、 $Br-Z$ 、*t*-ブチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、 Tos 、4-メトキシ
-2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、
 Bum 、 Boc 、 Trt 、 $Fmoc$ などが用いられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水
20 物、アジド、活性エステル [アルコール (例えば、ペンタクロロフェノール、2,
4, 5-トリクロロフェノール、2, 4-ジニトロフェノール、シアノメチルア
ルコール、パラニトロフェノール、HONB、*N*-ヒドロキシスクシミド、*N*-
ヒドロキシフタルイミド、HOBt) とのエステル] などが用いられる。原料の
アミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いら
25 れる。

保護基の除去 (脱離) 方法としては、例えば、 Pd -黒あるいは Pd -炭素な
どの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタ
ンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれ
らの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミ

ン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約 -20°C ～ 40°C の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1, 4-ブタンジチオール、1, 2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2, 4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1, 2-エタンジチオール、1, 4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

タンパク質または部分ペプチドのアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（タンパク質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いたタンパク質または部分ペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したタンパク質または部分ペプチドとを製造し、これらのタンパク質またはペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護タンパク質またはペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗タンパク質またはペプチドを得ることができる。この粗タンパク質またはペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のタンパク質またはペプチドのアミド体を得ることができる。

タンパク質またはペプチドのエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、タンパク質またはペプチドのアミド体と同様にして、所望のタンパク

質またはペプチドのエステル体を得ることができる。

本発明で用いられる部分ペプチドまたはそれらの塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明で用いられるタンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明で用いられる部分ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の (i) ~ (v) に記載された方法が挙げられる。

- 10 (i) M. Bodanszky および M. A. Ondetti、ペプチド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966 年)
- (ii) Schroeder および Luebke、ザ・ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965 年).
- (iii) 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975 年)
- 15 (iv) 矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学 IV、205、(1977 年)
- (v) 矢島治明監修、続医薬品の開発、第 14 巻、ペプチド合成、広川書店

また、反応後は通常の前製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明で用いられる部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

本発明で用いられるタンパク質をコードするポリヌクレオチドとしては、前述した本発明で用いられるタンパク質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。好ましくは DNA である。DNA としては、ゲノム DNA、ゲノム DNA ライブラリー、前記した細胞・組織由来の cDNA、前記した細胞・組織由来の cDNA ライブラリー、合成 DNA のいずれでもよい。

ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コス

ミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織より total RNA または mRNA 画分を調製したものをを用いて直接 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR 法と略称する) によって増幅することもできる。

- 5 本発明で用いられるタンパク質をコードする DNA としては、例えば、配列番号：2 で表される塩基配列を含有する DNA、または配列番号：2 で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、前記した配列番号：1 で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードする DNA であれば何れのものでもよい。
- 10 また、例えば、配列番号：4 で表される塩基配列を含有する DNA、または配列番号：4 で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、前記した配列番号：3 で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードする DNA であれば何れのものでもよい。また、例えば、配列番号：6 で表される塩基配列を含有する DNA、または配列番号：6 で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、前記した配列番号：5 で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードする DNA であれば何れのものでもよい。また、例えば、配列番号：51 で表される塩基配列を含有する DNA、または配列番号：51 で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、前記した配列番号：50 で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードする DNA であれば何れのものでもよい。

- 例えば、配列番号：2 で表わされる塩基配列を有する DNA とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA としては、例えば、配列番号：2 で表わされる塩基配列と約 70% 以上、好ましくは約 80% 以上、より好ましくは約 90% 以上、さらに好ましくは約 95% 以上の相同性を有する塩基配列を含有する DNA などが用いられる。塩基配列の相同性は、相同性計算アルゴリズム NCBI BLAST (National Center for Biotech

hnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件 (期待値=10 ; ギャップを許す ; フィルタリング=ON ; マッチスコア=1 ; ミスマッチスコア=-3) にて計算することができる。

- 5 ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約 19 ~ 40 mM、好ましくは約 19 ~ 20 mM で、温度が約 50 ~ 70 °C、好ましくは約 60 ~ 65 °C の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約 19 mM で温度が約 65 °C の場合が最も好ましい。

- 15 より具体的には、配列番号 : 1 で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードする DNA としては、配列番号 : 2 で表される塩基配列を含有する DNA などが用いられる。

- 20 本発明で用いられる部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド (例、DNA) としては、前述した本発明で用いられる部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノム DNA、ゲノム DNA ライブラリー、前記した細胞・組織由来の cDNA、前記した細胞・組織由来の cDNA ライブラリー、合成 DNA のいずれでもよい。

- 25 本発明で用いられる部分ペプチドをコードする DNA としては、例えば、配列番号 : 2 で表される塩基配列を含有する DNA の一部分を有する DNA、または配列番号 : 2 で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードする DNA の一部分を含有する DNA などが用いられる。

配列番号 : 2 で表される塩基配列とハイブリダイズできる DNA は、前記と同意義を示す。

ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件は前記と同様のものが用いられる。

5 本発明で用いられるタンパク質、部分ペプチド（以下、これらをコードするDNAのクローニングおよび発現の説明においては、これらを単に本発明のタンパク質と略記する場合がある）を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のタンパク質をコードする塩基配列の一部分を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のタンパク質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュ
10 ラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

15 DNAの塩基配列の変換は、PCR、公知のキット、例えば、MutanTM-super Express Km (宝酒造 (株))、MutanTM-K (宝酒造 (株)) 等を用いて、ODA-LA PCR法、Gapped duplex 法、Kunkel 法等の自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

20 クローン化されたタンパク質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

25 本発明のタンパク質の発現ベクターは、例えば、(イ) 本発明のタンパク質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ) 該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド (例、pBR322, pBR32

5, pUC12, pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110, pTP5, pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19, pSH15)、 λ ファージなどのバクテリオファージ、アデノウイルス、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、
5 pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、p ϕ DNAI/Neoなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロ
10 モーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。

これらのうち、CMV(サイトメガロウイルス)プロモーター、SR α プロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trp
pプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 λ P_Lプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である
15 場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシ
20 グナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン(以下、SV40oriと略称する場合がある)などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素(以下、dhfrと略称する場合がある)遺伝子[メソトレキセート(MTX)耐性]、アンピシリン耐性遺伝子(以下、Amp^rと略称する場合がある)、ネオマイシン耐性遺伝子
25 (以下、Neo^rと略称する場合がある、G418耐性)等が挙げられる。特に、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のタンパク質のN

端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF α ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、例えば、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12・DH1 [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻, 160(1968)], JM103 [ヌクイレック・アシッツ・リサーチ (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology), 120巻, 517(1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600 [ジェネティックス (Genetics), 39巻, 440(1954)] などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (*Bacillus subtilis*) MI114 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)] などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R⁻, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12、シズサッカロマイセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC1913, NCYC2036、ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) KM71 などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由

来株化細胞 (Spodoptera frugiperda cell; S f 細胞)、Trichoplusia ni の中腸由来のMG 1細胞、Trichoplusia ni の卵由来の High Five™細胞、Mamestra brassicae 由来の細胞または Estigmena acrea 由来の細胞などが用いられる。ウイルスが B m N P V の場合は、蚕由来株化細胞 (Bombyx mori N 細胞; B m N 細胞) などが用いられる。該 S f 細胞としては、例えば、S f 9 細胞 (ATCC CRL1711)、S f 2 1 細胞 (以上、Vaughn, J. L. ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977)) などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる [前田ら、ネイチャー (Nature), 315 巻, 592 (1985)]。

動物細胞としては、例えば、サル細胞 COS-7, V e r o, チャイニーズハムスター細胞 CHO (以下、CHO 細胞と略記), d h f r 遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞 CHO (以下、CHO (d h f r⁻) 細胞と略記), マウス L 細胞, マウス A t T-20, マウスミエローマ細胞, マウス A T D C 5 細胞, ラット GH3, ヒト FL 細胞などが用いられる。さらに、ヒト癌細胞由来細胞株 (D L D-1 細胞、H C T-15 細胞、SW-480 細胞、L o V o 細胞、H C T-116 細胞、W i D r 細胞、H T-29 細胞、L S-174 T 細胞、S N U-C1 細胞、S N U-C4 細胞、S N U-C2A 細胞、C X-1 細胞、G I-112 細胞、H L-60 細胞、R a j i 細胞、G 3 6 1 細胞、S 3 細胞) なども用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69 巻, 2110 (1972) や ジーン (Gene), 17 巻, 107 (1982) などに記載の方法に従って行なうことができる。

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics), 168 巻, 111 (1979) などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 194 巻, 182-187 (1991)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエス

エー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75 巻, 1929 (1978) などに記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ／テクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-55 (1988) などに記載の方法に従って行なうことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊 8 新細胞工学実験プロトコル, 263-267 (1995) (秀潤社発行)、ウイルス学 (Virology), 52 巻, 456 (1973) に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、タンパク質をコードする DNA を含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、パレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地の pH は約 5～8 が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含む M9 培地 [ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972] が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3 β -インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約 15～43℃ で約 3～24 時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約 30～40℃ で約 6～24 時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505(1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330(1984)] が挙げられる。培地のpHは約5~8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃~35℃で約24~72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

10 宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., ネイチャー (Nature), 195, 788(1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2~6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3~5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

15 宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5~20%の胎児牛血清を含むMEM培地 [サイエンス (Science), 122巻, 501(1952)], DMEM培地 [ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396(1959)], RPMI 1640培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519(1967)], 199培地 [プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディシン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1(1950)] などが用いられる。pHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30℃~40℃で約15~60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

25 以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明のタンパク質を生成せしめることができる。

上記培養物から本発明のタンパク質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

本発明のタンパク質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、

公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりタンパク質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100TMなどの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にタンパク質が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるタンパク質の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離・精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

かくして得られるタンパク質が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生するタンパク質を、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

かくして生成する本発明のタンパク質の存在は、特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイやウエスタンブロッティングなどにより測定することができる。

本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩に対する抗体は、本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩を認識

し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであつてもよい。

本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩（以下、抗体の説明においては、これらを単に本発明のタンパク質と略記する場合がある）

- 5 に対する抗体は、本発明のタンパク質を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

〔モノクローナル抗体の作製〕

（a）モノクローナル抗体産生細胞の作製

- 10 本発明のタンパク質は、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

- 15 モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物の骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化タンパク質と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー（Nature）、256、495（1975）〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）
20 やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

25 骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などの温血動物の骨髓腫細胞が挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1：1～20：1程度であり、PEG（好ましくはPEG1000～PEG6000）

が10～80%程度の濃度で添加され、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

5 モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、タンパク質抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放
10 射性物質や酵素などで標識したタンパク質を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地として
15 は、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。
20 培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

（b）モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、自体公知の方法、例えば、免疫グロブリン
25 の分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

〔ポリクローナル抗体の作製〕

本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（タンパク質抗原）自体、あるいはそれとキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のタンパク質に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造することができる。

温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なわれる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

本発明で用いられるタンパク質または部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド（例、DNA（以下、アンチセンスポリヌクレオチドの説明においては、これらのDNAを本発明のDNAと略記する場合がある））の塩基配列に相補的な、

または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有するアンチセンスポリヌクレオチドとしては、本発明のDNAの塩基配列に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンスポリヌクレオチドであってもよいが、アンチセンスDNAが好ましい。

本発明のDNAに実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明のDNAに相補的な塩基配列（すなわち、本発明のDNAの相補鎖）の全塩基配列あるいは部分塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列などが挙げられる。

特に、本発明のDNAの相補鎖の全塩基配列うち、(イ) 翻訳阻害を指向したアンチセンスポリヌクレオチドの場合は、本発明のタンパク質のN末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）の相補鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアンチセンスポリヌクレオチドが、(ロ) RNase HによるRNA分解を指向するアンチセンスポリヌクレオチドの場合は、イントロンを含む本発明のDNAの全塩基配列の相補鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアンチセンスポリヌクレオチドがそれぞれ好適である。

具体的には、例えば、配列番号：2で表わされる塩基配列を含有するDNAの塩基配列に相補的な、もしくは実質的に相補的な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスポリヌクレオチド、好ましくは例えば、配列番号：2で表わされる塩基配列を含有するDNAの塩基配列に相補な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスポリヌクレオチド（より好ましくは、配列番号：2で表わされる塩基配列を含有するDNAの塩基配列に相補な塩基配列の一部分を有するアンチセンスポリヌクレオチド）などが挙げられる。

アンチセンスポリヌクレオチドは通常、10～40個程度、好ましくは15～30個程度の塩基から構成される。

ヌクレアーゼなどの加水分解酵素による分解を防ぐために、アンチセンスDNAを構成する各ヌクレオチドのりん酸残基（ホスフェート）は、例えば、ホスホ

ロチオエート、メチルホスホネート、ホスホロジチオネートなどの化学修飾りん酸残基に置換されていてもよい。また、各ヌクレオチドの糖（デオキシリボース）は、2'-O-メチル化などの化学修飾糖構造に置換されていてもよいし、塩基部分（ピリミジン、プリン）も化学修飾を受けたものであってもよく、配列番号：

- 5 2で表わされる塩基配列を有するDNAにハイブリダイズするものであればいずれのものでもよい。これらのアンチセンスポリヌクレオチドは、公知のDNA合成装置などを用いて製造することができる。

- 本発明に従えば、本発明のタンパク質遺伝子の複製または発現を阻害することのできるアンチセンス・ポリヌクレオチドを、クローン化した、あるいは決定されたタンパク質をコードするDNAの塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。
- 10 かかるポリヌクレオチド（核酸）は、本発明のタンパク質遺伝子のRNAとハイブリダイズすることができ、該RNAの合成または機能を阻害することができるか、あるいは本発明のタンパク質関連RNAとの相互作用を介して本発明のタンパク質遺伝子の発現を調節・制御することができる。本発明のタンパク質関連R
- 15 NAの選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、および本発明のタンパク質関連RNAと特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドは、生体内および生体外で本発明のタンパク質遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療または診断に有用である。用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列または核酸の特定の配列に相同性を有する
- 20 あるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列または核酸とペプチド（蛋白質）との間で「対応する」とは、ヌクレオチド（核酸）の配列またはその相補体から誘導される指令にあるペプチド（蛋白質）のアミノ酸を通常指している。タンパク質遺伝子の5'端ヘアピンループ、5'端6-ベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳開始コドン、蛋白質コード領域、
- 25 ORF翻訳終止コドン、3'端非翻訳領域、3'端パリンドローム領域、および3'端ヘアピンループは好ましい対象領域として選択しうるが、タンパク質遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的でハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドとの関係は、対象物と「アンチセンス」であるというこ

とができる。アンチセンス・ポリヌクレオチドは、2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリデオキシリボヌクレオチド、D-リボースを含有しているポリリボヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販の蛋白質核酸および合成配列特異的な核酸ポリマー）または特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、2本鎖DNA、1本鎖DNA、2本鎖RNA、1本鎖RNA、さらにDNA:RNAハイブリッドであることができる、さらに非修飾ポリヌクレオチド（または非修飾オリゴヌクレオチド）、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合または硫黄含有結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を持つもの、例えば蛋白質（ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリ-L-リジンなど）や糖（例えば、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレント化合物（例えば、アクリジン、ソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、 α アノマー型の核酸など）であってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」および「核酸」とは、プリンおよびピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。こうした修飾物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよびピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオチドおよび修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば、1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変

換されていてよい。

本発明のアンチセンス・ポリヌクレオチドは、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸（RNA、DNA）である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定されるものではない。本発明のアンチセンス核酸は次のような方針で好ましく設計される。すなわち、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチセンス核酸の毒性をより小さなものにする。

こうした修飾は当該分野で数多く知られており、例えば J. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp.247, 1992; Vol. 8, pp.395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993 などに開示がある。

本発明のアンチセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有していて良く、リポゾーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホスホリピド、コレステロールなど）といった疎水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例えば、コレステリルクロロホルメート、コール酸など）が挙げられる。こうしたものは、核酸の3' 端あるいは5' 端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができる。その他の基としては、核酸の3' 端あるいは5' 端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNAseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに

限定されるものではない。

アンチセンス核酸の阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいは本発明のタンパク質の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。該核酸それ自体公知の各種の方法で細胞に適用できる。

- 5 以下に、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩（以下、本発明のタンパク質と略記する場合がある）、本発明のタンパク質または部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド（例、DNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある））、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）、および本発明のDNAのアンチセンスポリヌクレオチド（以下、本発明のアンチセンスポリヌクレオチドと略記する場合がある）の用途を説明する。

（1）本発明のタンパク質が関与する各種疾病の予防・治療剤

本発明のタンパク質は、 Na^+ /グルコーストランスポーターとしてグルコースの能動輸送活性を有し、小腸においては、グルコース取り込みに寄与している。

- 15 本明細書において、「小腸」とは広義の小腸（即ち、十二指腸を含む）を示してもよいが、好ましくは狭義の小腸（即ち、十二指腸を含まない）を示す。また、グルコースの取り込みは、単糖類（例えば、グルコース、マンノース、フルクトース、ソルボース、ガラクトース、リボース、アラビノース、キシロースなど）の取り込みに読み替えてもよいが、好ましくはグルコースの取り込みを示す。

- 20 したがって、本発明のタンパク質の活性や該タンパク質の遺伝子の発現量を、小腸において減少させることにより、食後過血糖の改善などに有効であり、例えば、糖尿病、肥満症、高脂血症、代謝症候群などの疾患の治療・予防剤などの医薬として使用することができる。また、本発明のタンパク質の活性や該タンパク質の遺伝子の発現量を、小腸において亢進させることにより、グルコースの吸収促進剤など低血糖治療薬、胃腸薬などの医薬として使用することができる。

例えば、小腸において本発明のタンパク質が減少あるいは欠損しているために、グルコースの小腸への取り込みが十分に、あるいは正常に発揮されない患者がいる場合に、（イ）本発明のDNAを該患者に投与し、生体内で本発明のタンパク質を発現させることによって、（ロ）細胞に本発明のDNAを挿入し、本発明の

タンパク質を発現させた後に、該細胞を患者に移植することによって、または(ハ)本発明のタンパク質を該患者に投与することなどによって、該患者における本発明のタンパク質の役割を十分に、あるいは正常に発揮させることができる。

また、例えば、小腸において本発明のタンパク質の発現が亢進しているために、
5 グルコースの小腸への取り込みが亢進され、食後過血糖の症状を呈している患者がいる場合に、(イ)本発明のアンチセンスDNAを該患者に投与することによって、(ロ)本発明の抗体を産生する細胞を患者に移植することによって、または(ハ)本発明の抗体を該患者に投与することによって、該患者における本発明のタンパク質の役割を抑制させることができる。

10 本発明のDNA(アンチセンスDNAも含む)を上記の予防・治療剤として使用する場合は、本発明のDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って、ヒトまたはその他の温血動物に投与することができる。本発明のDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のための補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイ
15 ドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

本発明のタンパク質を上記の予防・治療剤として使用する場合は、少なくとも90%、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上に精製されたものを使用するのが好ましい。

20 本発明のタンパク質は、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のタンパク質等を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一
25 般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セル

ロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料に
5 さらに油脂のような液状担体を含むことができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を
10 含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノールなど）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート 80TM、HCO-50 など）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油
15 などが挙げられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。
20 調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。

本発明のDNAが挿入されたベクターも上記と同様に製剤化され、通常、非経口的に使用される。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、温血動物（例えば、ヒト、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、
25 ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して投与することができる。

本発明のタンパク質の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、グルコースの吸収促進剤の目的で本発明のタンパク質等を経口投与する場合、一般的に成人（体重 60 kg として）においては、一日に

つき該タンパク質を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該タンパク質等の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、グルコースの吸収促進剤の目的で本発明のタンパク質等を注射剤の形で成人（体重60kgとして）に投与する場合、一日につき該タンパク質等を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を患部に注射することにより投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kgあたりに換算した量を投与することができる。

配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質（以下、ヒトSGLTホモログタンパクと表記することがある）はヒトの小腸、膵臓、肝臓において組織特異的に高発現するので、例えば糖尿病などの疾患マーカーとして利用することが出来る。すなわち、糖尿病における早期診断、症状の重症度の判定、疾患進行の予測のためのマーカーとして有用である。

小腸においてヒトSGLTホモログタンパク質の活性を阻害する化合物もしくはその塩を含有する医薬は、例えば小腸へのグルコース取り込みを阻害し、血糖値を減少できるので、例えば、食後過血糖改善剤などとして有用であり、また、例えば、糖尿病、肥満症、高脂血症、代謝症候群などの治療・予防剤として使用することができる。

一方、小腸においてヒトSGLTホモログタンパク質の活性を促進する化合物もしくはその塩を含有する医薬は、例えば小腸へのグルコース取り込みを促進できるので、例えば、グルコースの吸収促進剤などとして有用であり、また、例えば、低血糖治療薬、胃腸薬として使用することができる。

（2）疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング

本発明のタンパク質の活性を調節（促進または阻害、好ましくは阻害）する化合物もしくはその塩、本発明のタンパク質の遺伝子の発現を調節（促進または阻害、好ましくは阻害）する化合物もしくはその塩は、例えば、食後過血糖改善剤またはグルコースの吸収促進剤などとして使用することができる。好ましくは食後過血糖改善剤などである。

したがって、本発明のタンパク質は、本発明のタンパク質の活性を調節（促進または阻害、好ましくは阻害）する化合物もしくはその塩、本発明のタンパク質の遺伝子の発現を調節（促進または阻害、好ましくは阻害）する化合物もしくはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

- 5 すなわち本発明は、本発明のタンパク質を用いることを特徴とする本発明のタンパク質の活性を調節（促進または阻害、好ましくは阻害）する化合物、あるいは本発明のタンパク質の遺伝子の発現を調節（促進または阻害、好ましくは阻害）する化合物のスクリーニング方法を提供する。より具体的には、上記スクリーニング方法においては、例えば、(1)試験化合物存在下と(2)試験化合物非存在下の
10 場合における、本発明のタンパク質の遺伝子発現量を測定して、比較することを特徴とするものである。

上記スクリーニング方法においては、例えば、(1)と(2)の場合における、小腸へのグルコース取り込み作用と本発明のタンパク質の遺伝子発現量を測定して、比較することを特徴とするものである。

- 15 また、本発明は、

(1) 本発明のタンパク質を用いることを特徴とする本発明のタンパク質の活性（例えば、グルコースの能動輸送活性など）を促進または阻害する化合物またはその塩（以下、それぞれ促進剤、阻害剤と略記する場合がある）のスクリーニング方法を提供し、より具体的には、例えば、

- 20 (2) (i) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞の糖取り込み活性と(ii) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞と試験化合物の混合物の糖取り込み活性の比較を行なうことを特徴とする促進剤または阻害剤のスクリーニング方法を提供する。

- 25 具体的には、前記スクリーニング方法においては、例えば、(i)と(ii)の場合において、糖取り込み活性を³H標識したグルコースまたは2-deoxy-glucoseなどのグルコース類縁体の細胞内への蓄積を放射活性で測定し、グルコースの能動輸送活性の指標として比較することを特徴とするものである。

本発明のスクリーニングにおいては、タンパク質を産生する能力を有する細胞に、グルコースの能動輸送活性阻害剤（例、フロリジン）などをポジティブコン

トロールとして使用してもよい。

すなわち、本発明は

- (i) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞に、 ^3H 標識したグルコースまたはグルコース類縁体を取り込ませると同時もしくは取り込ませる前に、グル
5 コースの能動輸送活性阻害剤を添加した場合と、(ii) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞に、 ^3H 標識したグルコースまたはグルコース類縁体を取り込ませると同時もしくは取り込ませる前に、グルコースの能動輸送活性賦活化剤または阻害剤、および試験化合物を添加した場合とを比較し、その取り込み量の変化を測定することを特徴とする促進剤または阻害剤のスクリーニング方法を提
10 供する。

本発明のタンパク質のグルコースの能動輸送活性は、公知の方法、例えば、
Cloning and functional expression of an SGLT-1-like protein from the *Xenopus laevis* intestine (Am. J. Physiol. 276: G1251-G1259, 1999)に記載の方法あるいはそれに準じる方法に従って測定することができる。

- 15 例えば、前記 (ii) の場合におけるグルコースの能動輸送活性を、前記 (i) の場合に比べて、約 20% 以上、好ましくは 30% 以上、より好ましくは約 50% 以上促進する試験化合物を本発明のタンパク質の活性を促進する化合物またはその塩として選択することができる。

- また、例えば、前記 (ii) の場合におけるグルコースの能動輸送活性を、前記
20 (i) の場合に比べて、約 20% 以上、好ましくは 30% 以上、より好ましくは約 50% 以上阻害（または抑制）する試験化合物を本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩として選択することができる。

- また、本発明のタンパク質 SGLT ホモログ遺伝子のプロモーター下流に分泌型アルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼなどの遺伝子を挿入し、前記の各種細胞
25 に発現させ、該細胞に前記試験化合物を接触させた場合における酵素活性を賦活化または阻害する化合物またはその塩を探索することによって本発明のタンパク質（SGLT ホモログ）の発現を促進または抑制（すなわち、本発明のタンパク質の活性を促進または阻害）する化合物またはその塩をスクリーニングすることができる。

更に遺伝子産物によって発現が制御されると考える遺伝子などのプロモーターを用いたレポーター・ジーン・アッセイにおいてその活性の調節を特徴とするスクリーニング法を提供する。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク質、生体由来非ペプチド性化合物（糖質、脂質など）、合成化合物、微生物培養物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

上記のスクリーニング方法を実施するには、本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞をスクリーニングに適した培地を用いて培養する。培地は、本発明のタンパク質の遺伝子発現に影響を与えないものであればいずれでもよい。

本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞としては、例えば、前述した本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターで形質転換された宿主（形質転換体）が用いられる。宿主としては、例えば、COS7細胞、CHO細胞、HEK293細胞などの動物細胞が好ましく用いられる。該スクリーニングには、例えば、前述の方法で培養することによって、本発明のタンパク質を細胞に発現させた形質転換体が好ましく用いられる。本発明のタンパク質を発現し得る細胞の培養方法は、前記した本発明の形質変換体の培養法と同様である。また、本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞としては、上述の形質転換体のみならず、SGLTホモログを産生する能力を有するヒトまたは温血動物の小腸上皮細胞などを用いてもよい。また、この時の細胞は単離された細胞であってもよく、あるいは、該細胞を含有する組織、器官などの形態で用いてもよい。

試験化合物としては、例えばペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などがあげられる。

本発明のタンパク質の活性を促進する活性を有する化合物は、本発明のタンパク質の作用を増強するための安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明のタンパク質の活性を阻害する活性を有する化合物は、本発明のタンパク質の生理活性を抑制するための安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる

化合物またはその塩は、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物である。該化合物の塩としては、前記した本発明のペプチドの塩と同様のものが用いられる。

- 5 さらに、本発明のタンパク質をコードする遺伝子も、小腸において発現が多く見られるので、本発明のタンパク質をコードする遺伝子の発現を調節する化合物またはその塩も、例えば、食後過血糖改善剤またはグルコースの吸収促進剤として使用することができる。好ましくは食後過血糖改善剤などである。

- 10 したがって、本発明のポリヌクレオチド（例、DNA）は、本発明のタンパク質をコードする遺伝子の発現を調節する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

- 15 スクリーニング方法としては、(iii) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞を培養した場合と、(iv) 試験化合物の存在下、本発明で用いられるタンパク質を産生する能力を有する細胞を培養した場合との比較を行うことを特徴とするスクリーニング方法が挙げられる。

上記方法において、(iii) と (iv) の場合における、前記遺伝子の発現量（具体的には、本発明のタンパク質量または前記タンパク質をコードする mRNA 量）を測定して、比較する。

- 20 試験化合物および本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞としては、上記と同様のものが挙げられる。

タンパク質量の測定は、公知の方法、例えば、本発明のタンパク質を認識する抗体を用いて、細胞抽出液中などに存在する前記タンパク質を、ウェスタン解析、ELISA 法などの方法またはそれに準じる方法に従い測定することができる。

- 25 本発明の遺伝子発現量は、自体公知の方法、例えば、ノーザンブロッティングや Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) や TaqMan polymerase chain reaction などの方法あるいはそれに準じる方法にしたがって測定することができる。

例えば、上記 (iv) の場合における遺伝子発現量を、上記 (iii) の場合に比べて、約 20% 以上、好ましくは 30% 以上、より好ましくは約 50% 以上阻害するあるいは増

強する試験化合物を本発明のタンパク質の活性を阻害するあるいは増強する化合物として選択することができる。

5 本発明のスクリーニング用キットは、本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩、または本発明で用いられるタンパク質もしくは部分ペプチドを産生する能力を有する細胞を含有するものである。

10 本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物またはその塩であり、本発明のタンパク質の活性あるいは本発明のタンパク質の遺伝子の発現を調節する化合物またはその塩である。

該化合物の塩としては、前記した本発明のタンパク質の塩と同様のものが用いられる。

15 本発明のタンパク質の活性を調節する化合物またはその塩、および本発明のタンパク質をコードする遺伝子の発現を調節する化合物またはその塩はそれぞれ、例えば、食後過血糖改善剤またはグルコースの吸収促進剤などとして有用である。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上述の治療・予防剤として使用する場合、常套手段に従って製剤化することができる。

20 例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などがあげられる。かかる組成物は自体公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、
25 賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどが用いられる。

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などが用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤、関節内注射剤などの剤形を包含する。かかる注射剤は、自体公知の方法に従って、例

例えば、上記化合物またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート 80、HCO-50 (polyoxyethylene (50mol) adduct of hydrogenated castor oil)〕などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、上記化合物またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。

上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤などが例示され、それぞれの投薬単位剤形当たり通常 5～500 mg、とりわけ注射剤では 5～100 mg、その他の剤形では 10～250 mg の上記化合物が含有されていることが好ましい。

なお前記した各組成物は、上記化合物との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して経口的にまたは非経口的に投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、食後過血糖改善剤の目的で本発明のタンパク質の活性を調節する化合物またはその塩を経口投与する場合、一般的に成人（体重 60 kg として）においては、一日につき該化合物またはその塩を約 0.1～100 mg、好ましくは約 1.0～50 mg、より好ましくは約 1.0～20 mg 投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物またはその塩の 1 回投与量は投

与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、食後過血糖改善剤の目的で本発明のタンパク質の活性を調節する化合物またはその塩を注射剤の形で通常成人（体重60kgとして）に投与する場合、一日につき該化合物またはその塩を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を小腸に注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kgあたりに換算した量を投与することができる。

（2a）本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはその塩の定量

本発明のタンパク質に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）は、本発明のタンパク質を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のタンパク質の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。

すなわち、本発明は、

（i）本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明のタンパク質とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のタンパク質の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質の定量法、および

（ii）被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の別の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質の定量法を提供する。

上記（ii）の定量法においては、一方の抗体が本発明のタンパク質のN端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のタンパク質のC末端部に反応する抗体であることが望ましい。

また、本発明のタンパク質に対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明のタンパク質の定量を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子の $F(ab')_2$ 、 Fab' 、あるいは Fab 画分を用いてもよい。

本発明の抗体を用いる本発明のタンパク質の定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、タンパク質量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体－抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これ

を既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

- 5 標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{131}\text{I}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。
- 10 抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常タンパク質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が挙げられる。
- 15 サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ（2次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のタンパク質量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なっても
- 20 よい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法による本発明のタンパク質の測定法においては、1次

反応と2次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、本発明のタンパク質の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、本発明のタンパク質のC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。

競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原(F)と、抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の方法、操作法に当業者の通常技術的配慮を加えて本発明のタンパク質の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。

例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入

江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol.

- 5 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))(以上、アカデミックプレス社発行)などを参照することができる。

以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明のタンパク質を感度良く定量することができる。

- 15 また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のタンパク質を検出するために使用することができる。また、本発明のタンパク質を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のタンパク質の検出、被検細胞内における本発明のタンパク質の挙動の分析などのために使用することができる。

(3) 遺伝子診断薬

- 20 本発明の DNA は、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトまたは温血動物(例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、サル、チンパンジーなど)における本発明のタンパク質または部分ペプチドをコードする DNA または mRNA の異常(遺伝子異常)を検出することができるので、例えば、該 DNA または mRNA の損傷、突然変異あるいは発
- 25 現低下や、該 DNA または mRNA の増加あるいは発現過多などの遺伝子診断薬として有用である。

本発明の DNA を用いる上記遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションや PCR-SSCP 法(ゲノミックス(Genomics), 第5巻, 874~879 頁、1989 年、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サ

イエンシズ・オブ・ユーエスエー (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America), 第 86 巻, 2766~2770 頁、1989 年) などにより実施することができる。

(4) アンチセンスポリヌクレオチドを含有する医薬

- 5 本発明の DNA に相補的に結合し、該 DNA の発現を調節することができるアンチセンスポリヌクレオチドは低毒性であり、生体内における本発明のタンパク質または本発明の DNA の機能を調節 (好ましくは抑制) することができるので、例えば、食後過血糖改善剤などとして使用することができる。

- 10 上記アンチセンスポリヌクレオチドを上記の予防・治療剤として使用する場合、自体公知の方法にしたがって製剤化し、投与することができる。

- 例えば、該アンチセンスポリヌクレオチドを用いる場合、該アンチセンスポリヌクレオチドを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエイテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段にしたがって、ヒトまたは哺乳動物 (例えば、ラット、ウサギ、
15 ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど) に対して経口的または非経口的に投与することができる。該アンチセンスポリヌクレオチドはそのまま、あるいは摂取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。あるいは、エアロゾル化して吸入剤として気管内に局所投与することもできる。

- 20 さらに、体内動態の改良、半減期の長期化、細胞内取り込み効率の改善を目的に、前記のアンチセンスポリヌクレオチドを単独またはリポソームなどの担体とともに製剤 (注射剤) 化し、静脈、皮下、関節腔内等に投与してもよい。

- 該アンチセンスポリヌクレオチドの投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、食後過血糖改善剤の目的で本発明のアンチ
25 センスポリヌクレオチドを投与する場合、一般的に成人 (体重 60 kg) においては、一日につき該アンチセンスポリヌクレオチドを約 0.1~100 mg 投与する。

さらに、該アンチセンスポリヌクレオチドは、組織や細胞における本発明の DNA の存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブと

して使用することもできる。

上記アンチセンスポリヌクレオチドと同様に、本発明のタンパク質をコードするRNAの一部を含有する二重鎖RNA（本発明のポリヌクレオチドに対する siRNA）、本発明のタンパク質をコードするRNAの一部を含有するリボザイム、
5 本発明のタンパク質が結合するDNA配列に対するデコイオリゴヌクレオチドなども、本発明の遺伝子の発現を抑制することができ、生体内における本発明で用いられるタンパク質または本発明で用いられるDNAの機能を抑制することができるので、例えば、食後過血糖改善剤などとして使用することができる。

10 二重鎖RNAは、公知の方法（例、Nature, 411 巻, 494 頁, 2001 年）に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。

リボザイムは、公知の方法（例、TRENDS in Molecular Medicine, 7 巻, 221 頁, 2001 年）に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。例えば、本発明のタンパク質をコードするRNAの一部に公知のリボザイムを連結することによって製造することができる。本発明のタンパク
15 質をコードするRNAの一部としては、公知のリボザイムによって切断され得る本発明のRNA上の切断部位に近接した部分（RNA断片）が挙げられる。

デコイオリゴヌクレオチドは、公知の方法（例、The Journal of Clinical Investigation, 106 巻, 1071 頁, 2000 年）に準じて、本発明のタンパク質が結合するDNAの配列を基に設計して製造することができる。具体的には、該デコ
20 イオリゴヌクレオチドとしては、本発明のタンパク質が結合するDNAの配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のタンパク質が結合し得るものであれば何れのものでもよい。本発明のタンパク質が結合するDNAの配列とハイブリダイズできる塩基配列としては、例えば、本発明のタンパク質が結合するDNAの配列と約70%以上、好ましくは約80%
25 以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列などが用いられる。

上記の二重鎖RNA、リボザイムまたはデコイオリゴヌクレオチドを上記予防・治療剤として使用する場合、アンチセンスポリヌクレオチドと同様にして製剤化し、投与することができる。

(5) 本発明の抗体を含有する医薬

本発明のタンパク質の活性を中和する作用を有する本発明の抗体は、例えば食後過血糖改善剤などの予防・治療剤などの医薬もしくは診断薬として使用することができる。

- 5 本発明の抗体を含有する上記疾患の治療・予防剤は低毒性であり、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的（例、関節内投与）に投与することができる。投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、食後過血糖改善剤のために使用する場合には、本発明の抗体を1回量として、通常0.01～20 mg/kg体重程度、好ましくは0.1～10 mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1～5 mg/kg体重程度を、1日1～5回程度、好ましくは1日1～3回程度、粉末吸入剤により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。
- 10 15

- 本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記抗体またはその塩と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。かかる組成物は、経口または非経口投与（例、関節内投与）に適する剤形として提供される。好ましくは吸入剤として提供される。
- 20

なお前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

(6) DNA転移動物

- 本発明は、外来性の本発明のタンパク質をコードするDNA（以下、本発明の外来性DNAと略記する）またはその変異DNA（本発明の外来性変異DNAと略記する場合がある）を有する非ヒト哺乳動物を提供する。
- 25

すなわち、本発明は、

- (1) 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、
- (2) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第(1)記載の動物、

(3) ゲッ歯動物がマウスまたはラットである第(2)記載の動物、および
(4) 本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを含有し、哺乳動物において
発現しうる組換えベクターを提供するものである。

本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物(以下、
5 本発明のDNA転移動物と略記する)は、未受精卵、受精卵、精子およびその始
原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生におけ
る胚発生の段階(さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般
に8細胞期以前)に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、
凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAEーデキス
10 トラン法などにより目的とするDNAを転移することによって作出することがで
きる。また、該DNA転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目
的とする本発明の外来性DNAを転移し、細胞培養、組織培養などに利用するこ
ともでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と自体公知の細胞融合法により
融合させることにより本発明のDNA転移動物を作出することもできる。

15 非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、
ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、
病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、ま
た、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス(例えば、純系として、C57B
L/6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F₁系統、BDF₁系統、
20 B6D2F₁系統、BALB/c系統、ICR系統など)またはラット(例えば、
Wistar, SDなど)などが好ましい。

哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、
上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどがあげられる。

25 本発明の外来性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDNA
ではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のDNAをいう。

本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異(例えば、
突然変異など)が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置
換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。

該異常DNAとしては、異常な本発明のタンパク質を発現させるDNAを意味

し、例えば、正常な本発明のタンパク質の機能を抑制するタンパク質を発現させるDNAなどが用いられる。

5 本発明の外来性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合したDNA
Aコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトDNAを転移させる場合、これと相同性が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のDNAを発現させうる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDNA
10 Aを結合したDNAコンストラクト（例、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA転移哺乳動物を作出することができる。

15 本発明のタンパク質の発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、 λ ファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウイルスなどのレトロウイルス、ワクシニアウイルスまたはバキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。

20 上記のDNA発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、1) ウイルス（例、シミアンウイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、JCウイルス、乳がんウイルス、ポリオウイルスなど）に由来するDNAのプロモーター、
2) 各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリンII、ウロプラキンII、エラスターゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレアチン
25 キナーゼ、グリア線維性酸性タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子 β 、ケラチンK1、K10およびK14、コラーゲンI型およびII型、サイクリックAMP依存タンパク質キナーゼ β Iサブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼ、心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ（一般にTie2と略される）、ナトリウ

ムカリウムアデノシン3リン酸化酵素 (Na, K-ATPase)、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインIおよびIIA、メタロプロティナーゼ1組織インヒビター、MHCクラスI抗原 (H-2L)、H-ras、レニン、ドーパミンβ-水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ (TPO)、ペプチド鎖延長因子1α (EF-1α)、βアクチン、αおよびβミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎タンパク質、チログロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、H鎖可変部 (VNP)、血清アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンC、平滑筋αアクチン、プレプロエンケファリンA、バソプレシンなどのプロモーターなどが用いられる。なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトペプチド鎖延長因子1α (EF-1α) のプロモーター、ヒトおよびニワトリβアクチンプロモーターなどが好適である。

上記ベクターは、DNA転移哺乳動物において目的とするメッセンジャーRNAの転写を終結する配列 (一般にターミネーターと呼ばれる) を有していることが好ましく、例えば、ウイルス由来および各種哺乳動物由来の各DNAの配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウイルスのSV40ターミネーターなどが用いられる。

その他、目的とする外来性DNAをさらに高発現させる目的で各DNAのスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核DNAのイントロンの一部などをプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流に連結することも目的により可能である。

正常な本発明のタンパク質の翻訳領域は、ヒトまたは各種哺乳動物 (例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど) 由来の肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来DNAおよび市販の各種ゲノムDNAライブラリーよりゲノムDNAの全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来RNAより公知の方法により調製された相補DNAを原料として取得することが出来る。また、外来性の異常DNAは、上記の細胞または組織より得られた正常なタンパク質の翻訳領域を点突然変異誘発法により変異した翻訳領域を作製することができる。

該翻訳領域は転移動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、前記

のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常のDNA工学的手法により作製することができる。

受精卵細胞段階における本発明の外來性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外來性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外來性DNAを保持することを意味する。本発明の外來性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外來性DNAを有する。

本発明の外來性正常DNAを転移させた非ヒト哺乳動物は、交配により外來性DNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。

受精卵細胞段階における本発明の外來性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外來性DNAが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外來性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外來性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外來性DNAを過剰に有する。

導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するように繁殖継代することができる。

本発明の正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することにより最終的に本発明のタンパク質の機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能亢進症や、本発明のタンパク質が関連する疾患の病態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、本発明の外來性正常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のタンパク質の増加症状を有することから、食後過血糖改善剤またはグルコースの吸収促進剤などのスクリーニング試験にも利用可能である。好ましくは食後過血

糖改善剤などのスクリーニング試験である。

一方、本発明の外来性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外来DNAを前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常のDNA工学的手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に本発明のタンパク質の機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症における本発明の異常タンパク質による正常タンパク質の機能阻害（dominant negative 作用）を解明するモデルとなる。

また、本発明の外来異常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のタンパク質の増加症状を有することから、例えば食後過血糖改善剤またはグルコースの吸収促進剤のスクリーニング試験にも利用可能である。好ましくは食後過血糖改善剤のスクリーニング試験である。

また、上記2種類の本発明のDNA転移動物のその他の利用可能性として、例えば、

- 1) 組織培養のための細胞源としての使用、
- 2) 本発明のDNA転移動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、またはDNAにより発現されたペプチド組織を分析することによる、本発明のタンパク質により特異的に発現あるいは活性化するペプチドとの関連性についての解析、
- 3) DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、
- 4) 上記3)記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および

- 5) 本発明の変異タンパク質を単離精製およびその抗体作製などが考えられる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症などを含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、本発明のタンパク質に関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。

また、本発明のDNA転移動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどのタンパク質分解酵素により、遊離したDNA転移細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明のタンパク質産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなどができ、本発明のタンパク質およびその作用解明のための有効な研究材料となる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症を含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA転移動物または本発明の外来性DNA発現ベクターを用いて、本発明のタンパク質が関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

(7) ノックアウト動物

本発明は、本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本

発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。

すなわち、本発明は、

- (1) 本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、
- (2) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺
- 5 伝子）を導入することにより不活性化された第（1）項記載の胚幹細胞、
- (3) ネオマイシン耐性である第（1）項記載の胚幹細胞、
- (4) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第（1）項記載の胚幹細胞、
- (5) ゲッ歯動物がマウスである第（4）項記載の胚幹細胞、
- (6) 本発明のDNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、
- 10 (7) 該DNAがレポーター遺伝子（例、大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺
伝子）を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNA
に対するプロモーターの制御下で発現しうる第（6）項記載の非ヒト哺乳動物、
- (8) 非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である第（6）項記載の非ヒト哺乳動物、
- (9) ゲッ歯動物がマウスである第（8）項記載の非ヒト哺乳動物、および
- 15 (10) 第（7）項記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発
現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進
または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAに人為的に変異を加えることにより、DNAの発現

20 能を抑制するか、もしくは該DNAがコードしている本発明のタンパク質の活性
を実質的に喪失させることにより、DNAが実質的に本発明のタンパク質の発現
能を有さない（以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある）非ヒト
哺乳動物の胚幹細胞（以下、ES細胞と略記する）をいう。

非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

- 25 本発明のDNAに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的
手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他DNAを挿入または置換させ
ることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読
み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊すること
により本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞（以下、本発明のDNA不活性化ES細胞または本発明のノックアウトES細胞と略記する）の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離し、そのエクソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはlacZ（ β -ガラクトシダーゼ遺伝子）、cat（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子）を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエクソンの機能を破壊するか、あるいはエクソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列（例えば、polyA付加シグナルなど）を挿入し、完全なメッセンジャーRNAを合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖（以下、ターゲッティングベクターと略記する）を、例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたES細胞について本発明のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上のDNA配列とターゲッティングベクター作製に使用した本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明のノックアウトES細胞を選別することにより得ることができる。

また、相同組換え法等により本発明のDNAを不活化させる元のES細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知 Evans と Kaufma の方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスのES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかなES細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF₁マウス（C57BL/6とDBA/2とのF₁）を用いて樹立したものなども良好に用いる。BDF₁マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これを用いて得られたES細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C57BL/6マウスとバッククロスすることでその遺伝的背景をC57BL/6マウスに代えることが可能である点で

有利に用い得る。

また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。

- 5 また、雌雄いずれのES細胞を用いてもよいが、通常雄のES細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。

ES細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の遺伝子を増幅、検出する方法が、その1例としてあげることができる。

- 10 この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約 10^6 個の細胞数を要していたのに対して、1コロニー程度のES細胞数(約50個)で済むので、培養初期におけるES細胞の第一次セクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

- 15 また、第二次セクションとしては、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られるES細胞の染色体数は正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞(例えば、マウスでは染色体数が $2n=40$ である細胞)に再びクローニングすることが望ましい。

- 20 このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でLIF(1-10000 U/ml)存在下に炭酸ガス培養器内(好ましくは、5%炭酸ガス、95%空気または5%酸素、5%炭酸ガス、90%空気)で約37℃で培養するなどの方法で
- 25 培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液(通常0.001-0.5%トリプシン/0.1-5 mM EDTA、好ましくは約0.1%トリプシン/1 mM EDTA)処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法などがとられる。このような継代は、通常1-3日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞

は放棄することが望まれる。

E S細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり [M. J. Evans 及び M. H. Kaufman, 5 ネイチャー (Nature) 第 292 巻、154 頁、1981 年 ; G. R. Martin プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) 第 78 巻、7634 頁、1981 年 ; T. C. Doetschman ら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第 87 巻、27 頁、1985 年]、本発明の E S細胞を分化させて得られる本発明の DNA 発現不全細胞は、インビトロにおける本発明のタンパク質の細胞生物学的検討において有用である。 10

本発明の DNA 発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物の mRNA 量を公知方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別することが可能である。

15 該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明の DNA 発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲッティングベクターの本発明の DNA が不活性化された DNA 配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の 20 本発明の DNA と入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明の DNA をノックアウトさせることができる。

本発明の DNA がノックアウトされた細胞は、本発明の DNA 上またはその近傍の DNA 配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはターゲッティングベクター上の DNA 配列と、ターゲッティングベクターに使用した 25 マウス由来の本発明の DNA 以外の近傍領域の DNA 配列とをプライマーとした PCR 法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明の DNA が不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8 細胞期の非ヒト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮

に移植する。作出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人為的に変異した本発明のDNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。

該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えた本発明のDNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体であり、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔から本発明のタンパク質のホモ発現不全個体を得ることができる。

卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えにより本発明のDNA座に変異のあるものを選択することにより得られる。

このようにして本発明のDNAがノックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該DNAがノックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。

さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、該不活化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活化DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1，ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の雌雄を交配することにより、該不活化DNAを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。

また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のタンパク質により誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、本発明のタンパク質の生物活性の不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明及

び治療法の検討に有用である。

(8a) 本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニング方法

5 本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。

該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものがあげられる。

10 試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

15 具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。

試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。

20 本発明のスクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸など）や塩基（例、アルカリ金属など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、25 プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

5 該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、該化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重 60 kg として）の食後過血糖患者においては、一日につき該化合物を約 0.1 ~ 100 mg、好ましくは約 1.0 ~ 50 mg、より好ましくは約 1.0 ~ 20 mg 投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の 1 回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、該化合物を注射剤の形で通常成人（体重 10 60 kg として）の食後過血糖患者に投与する場合、一日につき該化合物を約 0.01 ~ 30 mg 程度、好ましくは約 0.1 ~ 20 mg 程度、より好ましくは約 0.1 ~ 10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重 60 kg 当たりに換算した量を投与することができる。

（8b）本発明の DNA に対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物をスクリーニング方法 15

本発明は、本発明の DNA 発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明の DNA に対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

20 上記スクリーニング方法において、本発明の DNA 発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記した本発明の DNA 発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明の DNA がレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明の DNA に対するプロモーターの制御下で発現しうるものが用いられる。

25 試験化合物としては、前記と同様のものがあげられる。

レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子（lacZ）、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子などが好適である。

本発明の DNA をレポーター遺伝子で置換された本発明の DNA 発現不全非ヒ

ト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

例えば、本発明のタンパク質をコードするDNA領域の一部を大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子 (lacZ) で置換している場合、本来、本発明のタンパク質の発現する組織で、本発明のタンパク質の代わりにβ-ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-ガラクトピラノシド (X-gal) のようなβ-ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明のタンパク質の動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明のタンパク質欠損マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液 (PBS) で洗浄後、X-galを含む染色液で、室温または37℃付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1mM EDTA/PBS溶液で洗浄することによって、β-ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、lacZをコードするmRNAを検出してもよい。

上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物である。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸 (例、無機酸など) や塩基 (例、アルカリ金属など) などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸 (例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など) との塩、あるいは有機酸 (例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など) との塩などが用いられる。

本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物またはその塩は、本発明のタンパク質の発現の調節、該タンパク質の機能を調節することができるので、食後過血糖改善剤またはグルコースの吸収促進剤、好ましくは

食後過血糖改善剤として有用である。

さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

5 該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質またはその塩を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

10 該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）の食後過血糖患者においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、
15 例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人（体重60kgとして）の食後過血糖患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kgあたりに換算した量を投与することができる。
20

このように、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明のDNA発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療剤の開発に大きく貢献することができる。
25

また、本発明のタンパク質のプロモーター領域を含有するDNAを使って、その下流に種々のタンパク質をコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランスジェニック動物（遺伝子移入動物）を作成すれば、特異的にそのタンパク質を合成させ、その生体での作用を検討することも可能とな

る。さらに上記プロモーター部分に適当なレポーター遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、本発明のタンパク質そのものの体内での産生能力を特異的に促進もしくは抑制する作用を持つ低分子化合物の探索系として使用できる。

- 5 本明細書において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

	DNA	: デオキシリボ核酸
10	cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
	A	: アデニン
	T	: チミン
	G	: グアニン
	C	: シトシン
15	RNA	: リボ核酸
	mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
	dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
	dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
	dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
20	dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
	ATP	: アデノシン三リン酸
	EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
	SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
	Gly	: グリシン
25	Ala	: アラニン
	Val	: バリン
	Leu	: ロイシン
	Ile	: イソロイシン
	Ser	: セリン

	Th r	: スレオニン
	C y s	: システイン
	Me t	: メチオニン
	G l u	: グルタミン酸
5	A s p	: アスパラギン酸
	L y s	: リジン
	A r g	: アルギニン
	H i s	: ヒスチジン
	P h e	: フェニルアラニン
10	T y r	: チロシン
	T r p	: トリプトファン
	P r o	: プロリン
	A s n	: アスパラギン
	G l n	: グルタミン
15	p G l u	: ピログルタミン酸
	S e c	: セレノシステイン (selenocysteine)

又、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

	Me	: メチル基
	E t	: エチル基
20	B u	: ブチル基
	P h	: フェニル基
	T C	: チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基
	T o s	: p-トルエンスルフォニル
	CHO	: ホルミル
25	B z l	: ベンジル
	Cl ₂ -Bzl	: 2, 6-ジクロロベンジル
	B o m	: ベンジルオキシメチル
	Z	: ベンジルオキシカルボニル
	C l - Z	: 2-クロロベンジルオキシカルボニル

- Br-Z : 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
Boc : t-ブトキシカルボニル
DNP : ジニトロフェニル
Trt : トリチル
5 Bum : t-ブトキシメチル
Fmoc : N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
HOBT : 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
HOObt : 3,4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-1,2,3-
ベンゾトリアジン
10 HONB : 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミド
DCC : N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕

ヒトSGLTホモログタンパク質のアミノ酸配列を示す。

15 〔配列番号：2〕

配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するヒトSGLTホモログタンパク質をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：3〕

マウスSGLTホモログタンパク質のアミノ酸配列を示す。

20 〔配列番号：4〕

配列番号：3で表されるアミノ酸配列を有するマウスSGLTホモログタンパク質をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：5〕

ラットSGLTホモログタンパク質のアミノ酸配列を示す。

25 〔配列番号：6〕

配列番号：5で表されるアミノ酸配列を有するラットSGLTホモログタンパク質をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：7〕

実施例2(1)で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号： 8〕

実施例 2（1）で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号： 9〕

実施例 2（1）で用いられたプローブの塩基配列を示す。

5 〔配列番号： 10〕

実施例 2（1）で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号： 11〕

実施例 2（1）で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号： 12〕

10 実施例 2（2）で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号： 13〕

実施例 2（2）で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号： 14〕

実施例 2（2）で用いられたプローブの塩基配列を示す。

15 〔配列番号： 15〕

実施例 2（2）で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号： 16〕

実施例 2（2）で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号： 17〕

20 実施例 4 で用いられたペプチドのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号： 18〕

実施例 5（1）で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号： 19〕

実施例 5（1）で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

25 〔配列番号： 20〕

実施例 5（1）で用いられたプローブの塩基配列を示す。

〔配列番号： 21〕

実施例 5（1）で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号： 22〕

実施例 5 (1) で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：23〕

実施例 5 (2) で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：24〕

- 5 実施例 5 (2) で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：25〕

実施例 5 (2) で用いられたプローブの塩基配列を示す。

〔配列番号：26〕

実施例 5 (2) で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

- 10 〔配列番号：27〕

実施例 5 (2) で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：28〕

実施例 6 で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：29〕

- 15 実施例 6 で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：30〕

実施例 6 で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：31〕

実施例 6 で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

- 20 〔配列番号：32〕

実施例 6 で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：33〕

実施例 6 で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：34〕

- 25 実施例 6 で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：35〕

実施例 6 で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：36〕

実施例 6 で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：37〕

実施例6で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：38〕

実施例6で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

5 〔配列番号：39〕

実施例6で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：40〕

実施例6で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：41〕

10 実施例6で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：42〕

実施例6で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：43〕

実施例6で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

15 〔配列番号：44〕

実施例6で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：45〕

実施例6で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：46〕

20 実施例6で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：47〕

実施例6で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：48〕

実施例6で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

25 〔配列番号：49〕

実施例6で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：50〕

ハムスターSGLTホモログタンパク質のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：51〕

配列番号：50で表されるアミノ酸配列を有するハムスターSGLTホモログタンパク質をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：52〕

ハムスターSGLT1タンパク質のアミノ酸配列を示す。

5 〔配列番号：53〕

配列番号：53で表されるアミノ酸配列を有するハムスターSGLT1タンパク質をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：54〕

実施例10で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

10 〔配列番号：55〕

実施例10で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：56〕

実施例10で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：57〕

15 実施例10で用いられたプライマーの塩基配列を示す。

実施例

以下において、実施例により本発明をより具体的にするが、この発明はこれらに限定されるものではない。

20 実施例1

フロリジンによる糖取りこみ抑制作用の測定

WO 02/53738の実施例4に記載の方法に従って、ヒトSGLTホモログ (hSGLTh)、マウスSGLTホモログ (mSGLTh)、ラットSGLTホモログ (rSGLTh)、ヒトSGLT1 (hSGLT1)、ヒトSGLT2 (hSGLT2) 発現CHO細胞株を作製し、実験に用いた。SGLTによって選択的に細胞内に取りこまれるグルコースアナログである α -Methyl Glucose の取り込み実験は、Am. J. Physiol. 270 : G833-G843, 1996 および J. Clin. Invest 93 : 397-404, 1994 の方法に従って行った。細胞を 96well プレートに 1×10^5 細胞 / well、100 μ l 10% FBS 添加 DMEM 培地で播種し、37°C、一夜培養した。細胞をバッファー (125 mM N-Methyl-D-Glucamine, 1.2mM KH_2PO_4 ,

25

2.5mM CaCl₂, 1.2mM MgSO₄, 4mM Glutamine, 10mM HEPES (pH 7.2), 0.1mg/ml BSA) 150 μ l で3回洗浄後同バッファーで1時間培養し、残存するグルコースを除去した。バッファーを除去し、同バッファーおよび N-Methyl-D-Glucamine (NMDG) を NaCl あるいは NaCl + Phlorizin (Sigma 社) に置き換えたバッファー 90 μ l を添加した。1mM α -Methyl Glucose を各 well に 10 μ l (¹⁴C) α -Methyl Glucose (アマシャム ファルマシア バイオテク社) 0.02 μ Ci を含む) 添加し1時間後、冷 PBS バッファー 200 μ l で3回洗浄した。各 well に液体シンチレータ 100 μ l を添加し、細胞に取り込まれた ¹⁴C のカウントを測定した。

結果を表1および表2に示した。

〔表1〕 hSGLT1, hSGLT2, hSGLTh のフロリジン耐性度の比較

	α -Methyl Glucose の取込量 (control 群に対する%表示)		
	hSGLT1	hSGLT2	hSGLTh
control 群 (NMDG 添加・NaCl 非添加群)	100 \pm 18	100 \pm 15	100 \pm 12
NaCl 添加群	1039 \pm 186	830 \pm 99	767 \pm 85
NaCl + フロリジン 3 μ M 添加群	244 \pm 48	139 \pm 23	570 \pm 142
NaCl + フロリジン 100 μ M 添加群	60 \pm 14	48 \pm 8	124 \pm 19

〔表2〕 mSGLTh, rSGLTh のフロリジン耐性度の比較

	α -Methyl Glucose の取込量 (control 群に対する%表示)	
	mSGLTh	rSGLTh
control 群 (NMDG 添加・NaCl 非添加群)	100 \pm 6	100 \pm 1
NaCl 添加群	819 \pm 54	953 \pm 0
NaCl + フロリジン 15 μ M 添加群	521 \pm 35	643 \pm 76
NaCl + フロリジン 500 μ M 添加群	78 \pm 8	118 \pm 6

表1および表2から明らかなように、ヒト、マウス、ラット SGLT ホモログは、hSGLT1, hSGLT2 と同様に、 Na^+ 濃度に依存して α -Methyl Glucose を取り込んだが、Phlorizin への耐性が SGLT1、SGLT2 よりも強いことが証明された。

5 実施例 2.

ヒト消化管における SGLT ホモログの発現分布の解析

(1) TaqMan PCR によるヒト SGLT ホモログの発現量の解析

TaqMan PCR に用いるプライマーおよびプローブは、Primer Express ver. 1.0 (PE バイオシステムジャパン)を用いて検索し、プライマー

10 cccgatgctttccacatgcttc (配列番号: 7)、プライマー acaatgacctggtctgtgcacc (配列番号: 8)、プローブ acatcccttgccaggtctcattttcgg (配列番号: 9) を選択した。プローブのリポーター色素として、FAM (6-carboxyfluorescein) を付加した。

スタンダード DNA として、ヒト SGLT ホモログの PCR 断片を使用した。PCR 反応
15 における反応液の組成はヒト SGLT ホモログ DNA $1\mu\text{l}$ を鋳型として使用し、Pfu Turbo DNA Polymerase (STRATAGENE 社) $1\mu\text{l}$ 量、プライマー gggggccagaggatccaggtgta (配列番号: 10) およびプライマー gcaatcatcagccccgcagac (配列番号: 11) を各 $0.5\mu\text{M}$ 、dNTPs を $200\mu\text{M}$ 、および酵素に添付のバッファーを $5\mu\text{l}$ 加え、 $50\mu\text{l}$ の液量とした。PCR 反応は、 94°C ・
20 1 分の後、 96°C ・20 秒、 60°C ・30 秒、 72°C ・1 分のサイクルを 35 回繰り返し、最後に 72°C ・7 分の伸長反応を行った。この PCR 反応産物を 1% アガロースゲル電気泳動し、0.7 Kbp DNA 断片を切り出し、ゲルエクストラクションキット (Qiagen 社) を用いて DNA を抽出した。該 PCR 断片を $10^0 - 10^6$ コピー/ μl に調製してスタンダード DNA として使用した。

25 (2) TaqMan PCR によるヒト SGLT1 の発現量の解析

TaqMan PCR に用いるプライマーおよびプローブは、Primer Express ver. 1.0 (PE バイオシステムジャパン)を用いて検索し、プライマー

agcaccctcttcacatgga (配列番号: 12)、プライマー aaacaaccttcggcaatcat (配列番号: 13)、プローブ ccaaggtccgcaagagagcatctga (配列番号: 14)

を選択した。プローブのリポーター色素として、FAM (6-carboxyfluorescein) を付加した。

スタンダード DNA として、ヒト SGLT1 の PCR 断片を使用した。PCR 反応における反応液の組成はヒト SGLT1 DNA 1 μ l を鋳型として使用し、Pfu Turbo DNA

5 Polymerase (STRATAGENE 社) 1 μ l 量、プライマー tgtgtcgtcccttcagaatgtg (配列番号: 15) およびプライマー agaactagttcaggcaaaatatgcatg (配列番号: 16) を各 0.5 μ M、dNTPs を 200 μ M、および酵素に添付のバッファーを 5 μ l 加え、50 μ l の液量とした。PCR 反応は、94°C・1 分の後、96°C・20 秒、60°C・30 秒、72°C・1 分のサイクルを 35 回繰り返し、最後に 72°C・7 分の伸長反応を行った。

10 この PCR 反応産物を 1% アガロースゲル電気泳動し、1.0 Kbp DNA 断片を切り出し、ゲルエクストラクションキット (Qiagen 社) を用いて DNA を抽出した。該 PCR 断片を $10^0 - 10^6$ コピー/ μ l に調製してスタンダード DNA として使用した。

各組織の cDNA ソースとして、ヒト消化管 MTC パネル (クロンテック社) を使用した。上記プライマー (配列番号: 7) 200nM, 上記プライマー (配列番号: 8)

15 100nM, 上記プローブ (配列番号: 9) 50nM, 鋳型 DNA に、TaqMan Universal PCR Master Mix (PE バイオシステムズジャパン) を添付書類記載の規定量加え、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (PE バイオシステムズジャパン) で PCR 反応および解析を行った。

ヒト消化管 MTC パネル (クロンテック社) を用いて、TaqMan PCR 法でヒト SGLT
20 ホモログの発現分布を調べたところ、図 1 に示すとおり、食物由来のグルコースの主な吸収部位である空腸で最も高い発現が認められた。多糖類は十二指腸において膵アミラーゼによる分解を受け、空腸で主に吸収されるものと考えられる。

実施例 3

初代培養正常ヒト小腸上皮細胞における SGLT1, SGLT ホモログの発現解析

25 正常ヒト小腸上皮細胞 (Cell System-IE Cells) は、大日本製薬から購入した。コラーゲンコートプレート (24 穴プレート) に CS-2.0 培地 (25mM グルコース、10%FBS および抗生物質添加) で 2×10^5 cells/well 播種し、2 日置きに培地交換し 13 日間培養した。RNAeasy mini キット (Quiagen) を用いて、トータル RNA を抽出し、TaqMan Gold RT-PCR キット (PE biosystems) を用い、TaqMan PCR 法でヒト

SGLT (hSGLT) ホモログ、hSGLT1 の発現量を測定した。図 2 に示すとおり、正常ヒト小腸上皮細胞 (Cell System-IE Cells) において、hSGLT ホモログ (hSGLTh) は、hSGLT1 と同等以上に発現していた。

実施例 4

5 抗ヒト SGLT ホモログ抗体によるヒト小腸切片の免疫染色

(1) 抗ヒト SGLT ホモログペプチド抗体の作製

ヒト SGLT ホモログの 261-275 番目のペプチドの 275 番目のアミノ酸残基にシステインをつけたもの (クラボウ社) を免疫原ペプチド

[H-HisAsnLeuArgAspProValSerGlyAspIleProTrpGlyCys (配列番号: 17) -NH₂ =
10 H-HNLRDPVSGDIPWGC-NH₂] として使用した。N-(γ-マレイミドブチリロキシ)サクシニミド (GMBS) と Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) を混合し、室温で 40 分反応した。セファデックス G-25 カラムで分画し、マレイミド基の導入された KLH を得た。免疫原ペプチド 5mg とマレイミド基の導入された KLH を等量混合し 4℃ で 1 日間反応した。PBS buffer で 2 日間透析し、PBS buffer に 1mg/ml の濃度で
15 懸濁した。

完全フロイントアジュバントと抗原を等量で混合し (トータル 0.6 ml)、3 ヶ月齢の New Zealand white rabbit に皮下免疫した。以後、2~3 週間おきに同量の免疫原を不完全フロイントアジュバントとともに 3 回追加免疫した。

5mg の合成ペプチドと Sulfo-Link gel 5ml をシステインを介して結合させ、
20 PBS buffer で平衡化した。5ml の抗血清をペプチドを結合したゲルに通し、PBS buffer (5 ml) で 3 回洗浄した。ペプチドに結合した抗体を 0.1N グリシン-HCl buffer (pH 2.5) 8 ml で溶出した。2.4 ml の Tris buffer で中和し、抗ヒト SGLT ホモログペプチド抗体とした。

この抗体を用いて、ヒト小腸切片の免疫染色を行なったところ、Villi の基底
25 部から先端まで糖吸収部位である上皮細胞 (SGLT1 もここで発現している

(Eur. J. Physiol 430:151, 1995)) において、タンパクレベルで発現が確認された。結果を図 3 に示す。

実施例 5

糖尿病動物における SGLT ホモログの発現変動

糖尿病患者では、小腸からの糖吸収の亢進が認められている (Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 282:G241-G248 2002)。糖尿病モデルマウスである KKA^y と正常マウスの C57/BL6 および糖尿病モデルラットである Wistar fatty と正常ラットの Wistar lean の小腸における SGLT ホモログの発現量を TaqMan PCR 法で比較した。

(1) TaqMan PCR によるマウス SGLT ホモログの発現量の解析

TaqMan PCR に用いるプライマーおよびプローブは、Primer Express ver. 1.0 (PE バイオシステムズジャパン) を用いて検索し、

プライマー (5'-tgacagaccaggtgattgtg-3') [配列番号: 18]

10 プライマー (5'-gcacggagcctcccttg-3') [配列番号: 19]

プローブ (5'-ctcgcagccaacaatctttcacatg-3') [配列番号: 20]

を選択した。プローブのリポーター色素として、FAM (6-carboxyfluorescein) を付加した。

15 スタンダード DNA としてマウス SGLT ホモログの PCR 断片を使用した。PCR 反応における反応液の組成はマウス SGLT ホモログ DNA 1 μ l を鋳型として使用し、Pfu Turbo DNA polymerase (STRATAGENE 社) 1 μ l 量、プライマー

(5'-atctctaattgtccagcaatgtg-3') [配列番号: 21] およびプライマー

(5'-accagcttggggtaggcaat-3') [配列番号: 22] を各 0.5 μ M、dNTPs を 200 μ M、および酵素に添付のバッファーを 5 μ l 加え、50 μ l の液量とした。PCR 反応は、
20 94°C・1 分の後、96°C・20 秒、62°C・30 秒、72°C・30 秒のサイクルを 40 回繰り返し、最後に 72°C・7 分の伸長反応を行った。該 PCR 反応産物を 2% アガロースゲル電気泳動し、0.9 kbp DNA 断片を切り出し、ゲルエクストラクションキット

(Qiagen 社) を用いて DNA を抽出した。該 PCR 断片を $10^0 - 10^6$ コピー/ μ l に調整してスタンダード DNA として使用した。

25 糖尿病患者モデルマウスである KKA^y と正常マウスの C57/BL6 マウスより十二指腸および空回腸を摘出、ここから total RNA を抽出した。total RNA の抽出は ISOGEN (ニッポンジーン社) の方法に従った。得られた RNA 0.1 μ g を鋳型として TaqMan Reverse Transcription Reagents (Roche 社) の方法に従い、cDNA を合成した。この cDNA 1 μ l を鋳型とし、プライマー (5'-tgacagaccaggtgattgtg-3') [配

列番号：18] 200nM、プライマー (5'-gcacggagcctcccttg-3') [配列番号：19]
200nM、プローブ (5'-ctcgcagccaacaatctttcacatg-3') [配列番号：20] 50nM、
に TaqMan universal PCR Master mix (PE バイオシステムズジャパン) を添付書類
記載の規定量加え、ABI PRISM 7700 sequence Detection system (PE バイオシス
5 テムズジャパン) で PCR 反応および解析を行った。

(2) TaqMan PCR によるラット SGLT ホモログの発現量の解析

TaqMan PCR に用いるプライマーおよびプローブは、Primer Express ver. 1.0 (PE バ
イオシステムズジャパン) を用いて検索し、

プライマー (5'-ctcacagtcttggccacctg-3') [配列番号：23]

10 プライマー (5'-agaaccggctctctctggag-3') [配列番号：24]

プローブ (5'-tgcacggaccaggtgattgtgc-3') [配列番号：25]

を選択した。プローブのリポーター色素として、FAM (6-carboxyfluorescein) を付
加した。

スタンダード DNA としてラット SGLT ホモログの PCR 断片を使用した。PCR 反応
15 における反応液の組成はラット SGLT ホモログ DNA 1 μ l を鋳型として使用し、Pfu
Turbo DNA polymerase (STRATAGENE 社) 1 μ l 量、プライマー

(5'-tctggagtcagcctgcacacct-3') [配列番号：26] およびプライマー

(5'-cagccttctcagctgggctcag-3') [配列番号：27] を各 0.5 μ M、dNTPs を 200
 μ M、および酵素に添付のバッファーを 5 μ l 加え、50 μ l の液量とした。PCR 反応
20 は、94 $^{\circ}$ C・1 分の後、96 $^{\circ}$ C・20 秒、62 $^{\circ}$ C・30 秒、72 $^{\circ}$ C・30 秒のサイクルを 40 回
繰り返し、最後に 72 $^{\circ}$ C・7 分の伸長反応を行った。該 PCR 反応産物を 2%アガロ
ースゲル電気泳動し、0.9kbp DNA 断片を切り出し、ゲルエクストラクションキッ
ト (Qiagen 社) を用いて DNA を抽出した。該 PCR 断片を $10^0 - 10^6$ コピー/ μ l に
調整してスタンダード DNA として使用した。

25 糖尿病モデルラットである Wistar fatty と正常ラットの Wistar lean の小腸を
上部、中部、下部に分け、ここから total RNA を抽出した。total RNA の抽出は
ISOGEN (ニッポンジーン社) の方法に従った。この RNA 0.1 μ g を鋳型として TaqMan
Reverse Transcription Reagents (Roche 社) の方法に従い、cDNA を合成した。この
cDNA 1 μ l を鋳型とし、プライマー 200nM (5'-ctcacagtcttggccacctg-3') [配列番

号：23]、プライマー 200nM (5'-agaaccggctctctctggag-3') [配列番号：24]、
プローブ 50nM (5'-tgcacggaccaggtgattgtgc-3') [配列番号：25] に、TaqMan
universal PCR Master mix (PE バイオシステムズジャパン) を添付書類記載の規定
量加え、ABI PRISM 7700 sequence Detection system (PE バイオシステムズジャ
5 パン) で PCR 反応および解析を行った。

結果を図 4 および図 5 に示す。糖尿病モデル動物である KKA^y マウスと Wistar
fatty ラットの小腸では、それぞれ対照の正常動物に比べて、SGLT ホモログの発
現亢進が認められ、糖尿病における小腸での糖吸収の亢進、食後過血糖の原因と
なっていることが示唆された。

10 実施例 6

ヒト、マウス、ラット、ハムスター、サル小腸における SGLT ホモログの発現

ヒト、マウス、ラット、ハムスター、サル小腸における SGLT1, SGLT ホモログ
の発現量を RT-PCR 法で比較した。

RT-PCR による小腸における SGLT ホモログの発現解析

15 ヒト SGLT ホモログについては、ヒト空腸 cDNA (DCA 社) を鋳型とし、プライマ
ー 1 gggggccagaggatccaggtgta [配列番号：28]、およびプライマー 2
aaaatagccccagaggaagatgttga [配列番号：29] を用いて PCR 反応を行った。こ
の反応における反応液の組成は上記 cDNA 1 μ l を鋳型として使用し、Pfu Turbo DNA
Polymerase (STRATAGENE 社) 1 μ l 量、プライマー 1 およびプライマー 2 を各 0.5
20 μ M、dNTPs を 200 μ M、および酵素に添付のバッファーを 5 μ l 加え、50 μ l の液
量とした。PCR 反応は、94°C・1 分の後、96°C・20 秒、62°C・30 秒、72°C・1.5
分のサイクルを 40 回繰り返し、最後に 72°C・7 分の伸長反応を行った。同様にヒ
ト SGLT1 (NM_000343) についてはプライマー 3 atcctgactgggtttgcttt [配列番
号：30] およびプライマー 4 atgctgatgccaatcagcac [配列番号：31] を用い
25 て PCR を行い、反応条件は 96°C・20 秒、55°C・30 秒、72°C・30 秒を 40 回繰り返
し、他の条件はヒト SGLT ホモログの条件と同様とした。

ヒト actin についてはプライマー 5 agagctacgagctgcctgac [配列番号：32] お
よびプライマー 6 acatctgctggaaggtggac [配列番号：33] を用いて PCR を行い、
反応条件は 96°C・20 秒、64°C・30 秒、72°C・30 秒を 40 回繰り返し、他の条件は

ヒト SGLT ホモログの条件と同様とした。

以下にハムスターSGLT ホモログ、SGLT1、サル SGLT ホモログ、SGLT1、マウス SGLT ホモログ、SGLT1、およびラット SGLT ホモログ、SGLT1 の RT-PCR 反応条件について記す。

- 5 ハムスターSGLT ホモログおよび SGLT1 は 9 週齢、雄性シリアンハムスター小腸より抽出した RNA を鋳型として TaqMan reverse transcription reagents (Applied Biosystems 社) を用いてランダムプライマーから cDNA を合成した。この cDNA を鋳型として以下に記す PCR プライマーと反応条件で PCR 反応を行った。

ハムスターSGLT ホモログ

- 10 forward:tgccacagtacttgaagaaacgat [配列番号: 3 4]
reverse:tgaagaacattgggaggatt [配列番号: 3 5]
95°C 20 秒、50°C 30 秒、72°C 30 秒 を 40 回繰り返し
ハムスターSGLT1

- forward:caatgaagtaggagggtatgagg [配列番号: 3 6]
15 reverse:tggcgctgttgaagatggaggtc [配列番号: 3 7]
95°C 20 秒、56°C 30 秒、72°C 1 分 を 40 回繰り返し

サル SGLT ホモログおよび SGLT1 はカニクイザル小腸より抽出した RNA を鋳型として TaqMan reverse transcription reagents を用いてランダムプライマーから cDNA を合成した。この cDNA を鋳型として以下に記す PCR プライマーと反応条件
20 で PCR 反応を行った。

サル SGLT ホモログ

forward:atctctaattgtccagcaatgtg [配列番号: 3 8]
reverse:gcaatcatcagccccgcagac [配列番号: 3 9]
95°C 20 秒、57°C 30 秒、72°C 1 分 を 40 回繰り返し

- 25 サル SGLT1

forward:atcctgactgggtttgcttt [配列番号: 4 0]
reverse:atgctgatgccaatcagcac [配列番号: 4 1]
95°C 20 秒、55°C 30 秒、72°C 1 分 を 40 回繰り返し

マウス SGLT ホモログおよび SGLT1 は 8 週齢 雄性 KKA^y マウス小腸より抽出した

RNAを鋳型としてTaqMan reverse transcription reagentsを用いてランダムプライマーからcDNAを合成した。このcDNAを鋳型として以下に記すPCRプライマーと反応条件でPCR反応を行った。

マウス SGLT ホモログ

- 5 forward:ggcaatggaaccaggagtgtc [配列番号: 4 2]
reverse:tcacgcaaaatagccccagagaaag [配列番号: 4 3]
95°C 20 秒、60°C 30 秒、72°C 2.5 分 を40回繰り返す
マウス SGLT1 (NM_019810)

- forward:atggacagtagcaccttgagcc [配列番号: 4 4]
10 reverse:tcaggcaaaataggcatggcag [配列番号: 4 5]
95°C 20 秒、55°C 30 秒、72°C 2.5 分 を40回繰り返す

ラット SGLT ホモログおよび SGLT1 は22週齢 雄性 Wistar fatty ラット小腸より抽出したRNAを鋳型としてTaqMan reverse transcription reagentsを用いてランダムプライマーからcDNAを合成した。このcDNAを鋳型として以下に記すPCR

- 15 プライマーと反応条件でPCR反応を行った。

ラット SGLT ホモログ

- forward:caatggaacctggagcttcaag [配列番号: 4 6]
reverse:tcacgcaaaatagccccagagaaag [配列番号: 4 7]
95°C 20 秒、60°C 30 秒、72°C 2.5 分 を40回繰り返す
20 ラット SGLT1 (NM_013033)

- forward:atggacagtagcaccttgagcc [配列番号: 4 8]
reverse:tcaggcaaaataggcgtggcag [配列番号: 4 9]
95°C 20 秒、55°C 30 秒、72°C 2.5 分 を40回繰り返す

- 図6に示す結果のとおり、マウス、ラットでは、SGLT ホモログに比べて SGLT1
25 の発現が高いが、サルではヒトと同様に SGLT1, SGLT ホモログの発現が同等で、
ハムスターでは SGLT1 以上に SGLT ホモログの発現が認められた。

実施例 7

マウス、ラット、ハムスター小腸器官培養系による糖取り込み量の測定

小腸器官培養系による糖取り込み量の測定は、Peptides, 19: 1249-1253 1998

および J. Agric. Food Chem. 48 : 5618-5623 2000 の方法に従った。マウス、ラット、モルモット、ハムスターは、エーテル麻酔後頸動脈を切断して安楽死させた。空腸領域を切り出し、腸間膜脂肪を取り除き、管を切り開いて内容物を洗浄し、1cm 長に切り分けた。空腸切片をバッファー (125 mM N-Methyl-D-Glucamine (NMDG), 1.2mM KH_2PO_4 , 2.5mM CaCl_2 , 1.2mM MgSO_4 , 4mM Glutamine, 10mM HEPES (pH 7.2), 0.1mg/ml BSA) で 3 回洗浄後、48-well プレートに 1 個ずつ移した。同バッファーおよび NMDG を NaCl あるいは NaCl + Phlorizin 30 μM に置き換えたバッファー 270 μl を添加した。10mM α -Methyl Glucose, 10mM D-mannitol を各 well に 30 μl ([^{14}C] α -Methyl Glucose (AMG) (アマシヤム ファルマシア バイオテク社) 0.12 μCi , [^3H]D-mannitol (Perkin Elmer LifeSciences) 0.3 μCi を含む) を添加し、37°C、10 分間培養後、冷 PBS バッファー 300 μl で 3 回洗浄した。空腸切片を液体シンチレーション測定用ミニバイアルに移し、組織溶解剤 Solvable (Perkin Elmer LifeSciences) 500 μl を添加し、50°C で 2 時間処理して溶解した。液体シンチレータ Ultima Gold-XR (Perkin Elmer LifeSciences) 5ml を添加し、空腸切片に取り込まれた ^{14}C 、 ^3H のカウントを測定した。図 7 に示す結果のとおり、ハムスターの小腸では、フロリジンに耐性の強い SGLT 活性が認められ、SGLT ホモログの糖取り込み活性が確認された。

実施例 8

SGLT1 と SGLT ホモログの基質特異性の検討

ヒト SGLT ホモログまたはヒト SGLT1 導入 COS7 細胞を作製しそれぞれの基質特異性を検討した。 α -Methyl Glucose の取り込み実験は、Am. J. Physiol. 270:G833-G843, 1996 および J. Clin. Invest. 93:397-404, 1994 の方法に従って行った。細胞を 96 穴プレートに 3×10^4 細胞/well、100 μl 10% FBS 添加 DMEM 培地で播種し、37°C で一夜培養した。各 well を 125 mM の N-Methyl-D-Glucamine を添加した反応緩衝液 (1.2 mM KH_2PO_4 , 2.5 mM CaCl_2 , 1.2 mM MgSO_4 , 4 mM Glutamine, 10 mM HEPES (pH 7.2), 0.1 mg/ml BSA) で 3 回洗浄後、同緩衝液でさらに 1 時間培養し、細胞に残存するグルコースを除去した。次に 150 mM の NaCl を添加した上記反応緩衝液に Glucose または Galactose を 0, 1, 10 mM を添加したものを調製し、それぞれ各 well に 90 μl 添加した。さらに 0.02 μCi の [^{14}C] - α -Methyl

Glucose (アマシャム ファルマシア バイオテック社) を含有する終濃度 1 mM α -Methyl Glucose を各 well に 10 μ l ずつ添加し、1 時間の糖取り込み反応を行った。200 μ l の冷 PBS で 3 回洗浄した後、液体シンチレータを各 well に 100 μ l ずつ添加し、細胞に取り込まれた 14 C の量をシンチレーションカウンターで測定した。その結果、SGLT1 が Glucose と Galactose に対し親和性を持つのに対し、SGLT ホモログは Glucose に親和性はあるものの Galactose に対する親和性はほとんど無いことが示された。

実施例 9

SGLT1 または SGLT ホモログを介する糖取り込みの速度論的解析

- 10 ヒト SGLT ホモログまたはヒト SGLT1 導入 COS7 細胞を作製しそれぞれの糖取り込みの速度論的解析を行った。 α -Methyl Glucose の取り込み実験は、Am. J. Physiol. 270:G833-G843, 1996 および J. Clin. Invest. 93:397-404, 1994 の方法に従って行った。細胞を 96 穴プレートに 3×10^4 細胞/well、100 μ l 10% FBS 添加 DMEM 培地で播種し、37°C で一夜培養した。各 well を 125 mM の
- 15 N-Methyl-D-Glucamine を添加した反応緩衝液 (1.2 mM KH_2PO_4 , 2.5 mM CaCl_2 , 1.2 mM MgSO_4 , 4 mM Glutamine, 10 mM HEPES (pH7.2), 0.1 mg/ml BSA) で 3 回洗浄後、同緩衝液でさらに 1 時間培養し、細胞に残存するグルコースを除去した。次に 150 mM の NaCl を添加した上記反応緩衝液に α -Methyl Glucose を 0-20 mM を添加したものを調製し、それぞれ各 well に 90 μ l 添加した。さらに 0.02 μ Ci の
- 20 [14 C] - α -Methyl Glucose (アマシャム ファルマシア バイオテック社) を含有する終濃度 1 mM α -Methyl Glucose を各 well に 10 μ l ずつ添加し、1 時間の糖取り込み反応を行った。200 μ l の冷 PBS で 3 回洗浄した後、液体シンチレータを各 well に 100 μ l ずつ添加し、細胞に取り込まれた 14 C の量をシンチレーションカウンターで測定し、糖取り込みの K_m と V_{max} を測定した。その結果、SGLT1 が
- 25 $K_m = 1.8$ mM, $V_{max} = 3.9$ nmol/hour/ 10^6 cells であったのに対し、SGLT ホモログは $K_m = 7.9$ mM, $V_{max} = 8.0$ nmol/hour/ 10^6 cells であった。これらのことから SGLT1 が高親和性、低輸送能のトランスポーターであるのに対し、SGLT ホモログが低親和性、高輸送能のトランスポーターであることが示された。

実施例 10

シリアンハムスター由来 Na⁺/グルコーストランスポーター蛋白質をコードする cDNA のクローニング

鑄型となる cDNA は、9 週齢、雄性シリアンハムスター小腸より RNeasy キット (QIAGEN 社) のマニュアルに従って抽出した RNA をもとに、TaqMan reverse transcription reagents (Applied Biosystems 社) を用いてランダムプライマーから合成した。このハムスター小腸 cDNA を鑄型とし、SGLT ホモログのクローニングにはプライマー A (5' -gcaatggagcctggagattcag-3') [配列番号: 54] およびプライマー B (5' -agcctgcctctggtcttg-3') [配列番号: 55] のセットを用いて、また SGLT1 のクローニングのためにはプライマー C (5' -atggacagtagcaccttgagccccgcggtca-3') [配列番号: 56] およびプライマー D (5' -gattcaagcaaaatatccgtggcaaaaga-3') [配列番号: 57] を用いて PCR を行った。該反応における反応液の組成は上記 cDNA 10 ng を鑄型として使用し、Pfu Turbo DNA Polymerase (STRATAGENE 社) を 1 μ l、プライマーを各 0.5 μ M、dNTPs を 200 μ M、および酵素に添付のバッファーを 5 μ l 加え、50 μ l の液量とした。反応は、94°C, 1 分の後、96°C, 20 秒、58°C, 30 秒、72°C, 2 分 30 秒のサイクルを 40 回繰り返す、最後に 72°C, 7 分の伸長反応を行った。該反応産物を 1% アガロースゲル電気泳動で分離し、DNA 断片を切り出し、ゲルエクストラクションキット (QIAGEN 社) を用いてゲルから抽出した。抽出した DNA を TOPO ライゲーションキット (インビトロジェン社) の処方に従い、pCR Blunt II ベクターへサブクローニングした。これを大腸菌 TOP10 に導入し、cDNA クローンを得た。ハムスター SGLT ホモログ cDNA から予測されるアミノ酸配列を配列番号: 50 に、配列番号: 50 で示されるアミノ酸配列をコードする領域の塩基配列を配列番号: 51 に示す。ハムスター SGLT ホモログのアミノ酸配列のヒト、マウス、ラットの SGLT ホモログのアミノ酸配列に対する相対性はそれぞれ 86.4%, 88.4%, 88.3% であった。またハムスター SGLT1 cDNA から予測されるアミノ酸配列を配列番号: 52 に、配列番号: 52 で示されるアミノ酸配列をコードする領域の塩基配列を配列番号: 53 に示す。ハムスター SGLT1 のアミノ酸配列のヒト、マウス、ラットの SGLT 1 のアミノ酸配列に対する相対性はそれぞれ 83.9%, 89.7%, 90.6% であった。

実施例 1 1

ハムスターSGLT ホモログまたは SGLT1 を介する糖取り込み量の測定

ハムスターSGLT ホモログ糖取り込み量は以下の手法で測定できる。ハムスター小腸 cDNA よりクローニングしたハムスターSGLT ホモログまたは SGLT1 を動物細胞発現ベクターpcDNA3.1(インビトロジェン社)にサブクローニングすることによりハムスターSGLT ホモログまたは SGLT1 を動物細胞で発現せしめるベクターを構築する。該発現ベクター各 $1\mu\text{g}$ を FuGENE6 試薬 (Roche 社) で COS7 細胞 (5×10^5 細胞) に導入しそれぞれの発現細胞を得る。ハムスターSGLT ホモログまたは SGLT1 導入 COS7 細胞の α -Methyl Glucose の取り込み実験は、Am. J. Physiol. 270:G833-G843, 1996 および J. Clin. Invest. 93:397-404, 1994 の方法に従って行う。細胞を 96 穴プレートに 3×10^4 細胞/well、 $100\mu\text{l}$ 10% FBS 添加 DMEM 培地で播種し、 37°C で一夜培養する。細胞を 125 mM の N-Methyl-D-Glucamine を添加した反応緩衝液 (1.2 mM KH_2PO_4 , 2.5 mM CaCl_2 , 1.2 mM MgSO_4 , 4 mM Glutamine, 10 mM HEPES (pH7.2), 0.1 mg/ml BSA) で 3 回洗浄後、同緩衝液でさらに 1 時間培養し、細胞に残存するグルコースを除去する。150 mM の NaCl を添加した反応緩衝液に phlorizin(Sigma 社)を 0, 0.1, 1 mM を添加したものをそれぞれ各 well に $90\mu\text{l}$ 添加する。さらに $0.02\mu\text{Ci}$ の $[^{14}\text{C}]$ - α -Methyl Glucose (アマシヤムファルマシア バイオテック社) を含有する終濃度 1 mM α -Methyl Glucose を各 well に $10\mu\text{l}$ ずつ添加し、1 時間の糖取り込み反応を行う。 $200\mu\text{l}$ の冷 PBS で 3 回洗浄した後、液体シンチレータを各 well に $100\mu\text{l}$ ずつ添加し、細胞に取り込まれた ^{14}C の量をシンチレーションカウンターで測定する。

産業上の利用可能性

本発明で用いられるタンパク質の活性や遺伝子発現を調節する化合物またはその塩、該タンパク質の活性を調節する中和抗体は、例えば食後過血糖改善剤またはグルコースの吸収促進剤などとして使用することができる。また、本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、本発明で用いられるタンパク質の発現を調節することができ、例えば、食後過血糖改善剤などとして使用することができる。

請求の範囲

1. Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログの活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなる小腸でのグルコース取り込み阻害剤。
2. Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログの遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩を含有してなる小腸でのグルコース取り込み阻害剤。
3. 食後過血糖改善剤である請求項 1 または 2 記載の剤。
4. 糖尿病、肥満症または高脂血症予防・治療剤である請求項 1 ないし 3 記載の剤。
5. Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログの活性を促進する化合物またはその塩を含有してなる小腸でのグルコース取り込み促進剤。
6. Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログの遺伝子の発現を促進する化合物またはその塩を含有してなる小腸でのグルコース取り込み促進剤。
7. グルコースの吸収促進剤である請求項 5 または 6 記載の剤。
8. Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログが配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩である請求項 1 ないし 7 記載の剤。
9. Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログが配列番号：3 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩である請求項 1 ないし 7 記載の剤。
10. Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログが配列番号：5 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩である請求項 1 ないし 7 記載の剤。
11. Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログが配列番号：50 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩である請求項 1 ないし 7 記載の剤。
12. Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログをコードするポリヌクレオチドの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部分を含有するアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる小腸でのグルコース取り込み阻害剤。

1 3. 食後過血糖改善剤である請求項 1 2 記載の剤。

1 4. 糖尿病、肥満症または高脂血症の予防・治療剤である請求項 1 2 または 1 3 記載の剤。

5 1 5. Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログをコードするポリヌクレオチドが配列番号: 2、配列番号: 4、配列番号: 6 または配列番号: 5 1 で表される塩基配列と同一もしくは実質的に同一の塩基配列を含有するポリヌクレオチドである請求項 1 2 ないし 1 4 記載の剤。

1 6. Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログに対する抗体を含有してなる小腸でのグルコース取り込み阻害剤。

10 1 7. 食後過血糖改善剤である請求項 1 6 記載の剤。

1 8. 糖尿病、肥満症または高脂血症予防・治療剤である請求項 1 6 または 1 7 記載の剤。

15 1 9. Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログが配列番号: 1、配列番号: 3、配列番号: 5 または配列番号: 5 0 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩である請求項 1 6 ないし 1 8 記載の剤。

2 0. Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログに対する抗体を含有してなる食後過血糖の診断薬。

20 2 1. Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログをコードするポリヌクレオチドを含有してなる食後過血糖の診断薬。

2 2. Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログを用いることを特徴とする、該ホモログの小腸でのグルコース取り込み活性を調節する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

25 2 3. Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログが配列番号: 1、配列番号: 3、配列番号: 5 または配列番号: 5 0 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩である請求項 2 2 記載のスクリーニング方法。

2 4. Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログを含有することを特徴とする、該ホモログの小腸でのグルコース取り込み活性を調節する化合物または

その塩のスクリーニング用キット。

25. Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログをコードするポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、該ホモログの小腸でのグルコース取り込み活性を調節する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

- 5 26. Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログをコードするポリヌクレオチドが配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6または配列番号：51で表される塩基配列と同一もしくは実質的に同一の塩基配列を含有するポリヌクレオチドである請求項25記載のスクリーニング方法。

- 10 27. Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログをコードするポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、該ホモログの小腸でのグルコース取り込み活性を調節する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

28. Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログの活性を阻害すること
を特徴とする小腸でのグルコース取り込み阻害方法。

- 15 29. Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログの遺伝子の発現を阻害
することを特徴とする小腸でのグルコース取り込み阻害方法。

30. 食後過血糖改善方法である請求項28または29記載の方法。

31. 糖尿病、肥満症または高脂血症予防・治療方法である請求項28ないし30記載の方法。

- 20 32. Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログの活性を促進すること
を特徴とする小腸でのグルコース取り込み促進方法。

33. Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログの遺伝子の発現を促進
することを特徴とする小腸でのグルコース取り込み促進方法。

34. グルコースの吸収促進方法である請求項32または33記載の方法。

- 25 35. Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログの活性を阻害する化合物
またはその塩の有効量を哺乳動物に投与することを特徴とする小腸でのグル
コース取り込み阻害方法。

36. Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログの遺伝子の発現を阻害
する化合物またはその塩の有効量を哺乳動物に投与することを特徴とする小腸で
のグルコース取り込み阻害方法。

37. 食後過血糖改善方法である請求項35または36記載の方法。

38. 糖尿病、肥満症または高脂血症予防・治療方法である請求項35ないし37記載の方法。

5 39. Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログの活性を促進する化合物またはその塩の有効量を哺乳動物に投与することを特徴とする小腸でのグルコース取り込み促進方法。

40. Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログの遺伝子の発現を促進する化合物またはその塩の有効量を哺乳動物に投与することを特徴とする小腸でのグルコース取り込み促進方法。

10 41. グルコースの吸収促進方法である請求項39または40記載の方法。

42. 小腸でのグルコース取り込み阻害剤の製造のための Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログの活性を阻害する化合物またはその塩の使用。

43. 小腸でのグルコース取り込み阻害剤の製造のための Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログの活性を阻害する化合物またはその塩の使用。

15 44. 小腸でのグルコース取り込み阻害剤が食後過血糖改善剤である請求項42または43記載の使用。

45. 小腸でのグルコース取り込み阻害剤が糖尿病、肥満症または高脂血症予防・治療剤である請求項42ないし44記載の使用。

20 46. 小腸でのグルコース取り込み促進剤の製造のための Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログの活性を促進する化合物またはその塩の使用。

47. 小腸でのグルコース取り込み促進剤の製造のための Na^+ /グルコーストランスポーター (SGLT) ホモログの活性を促進する化合物またはその塩の使用。

48. 小腸でのグルコース取り込み促進剤がグルコースの吸収促進剤である請求項46または47記載の使用。

図 1

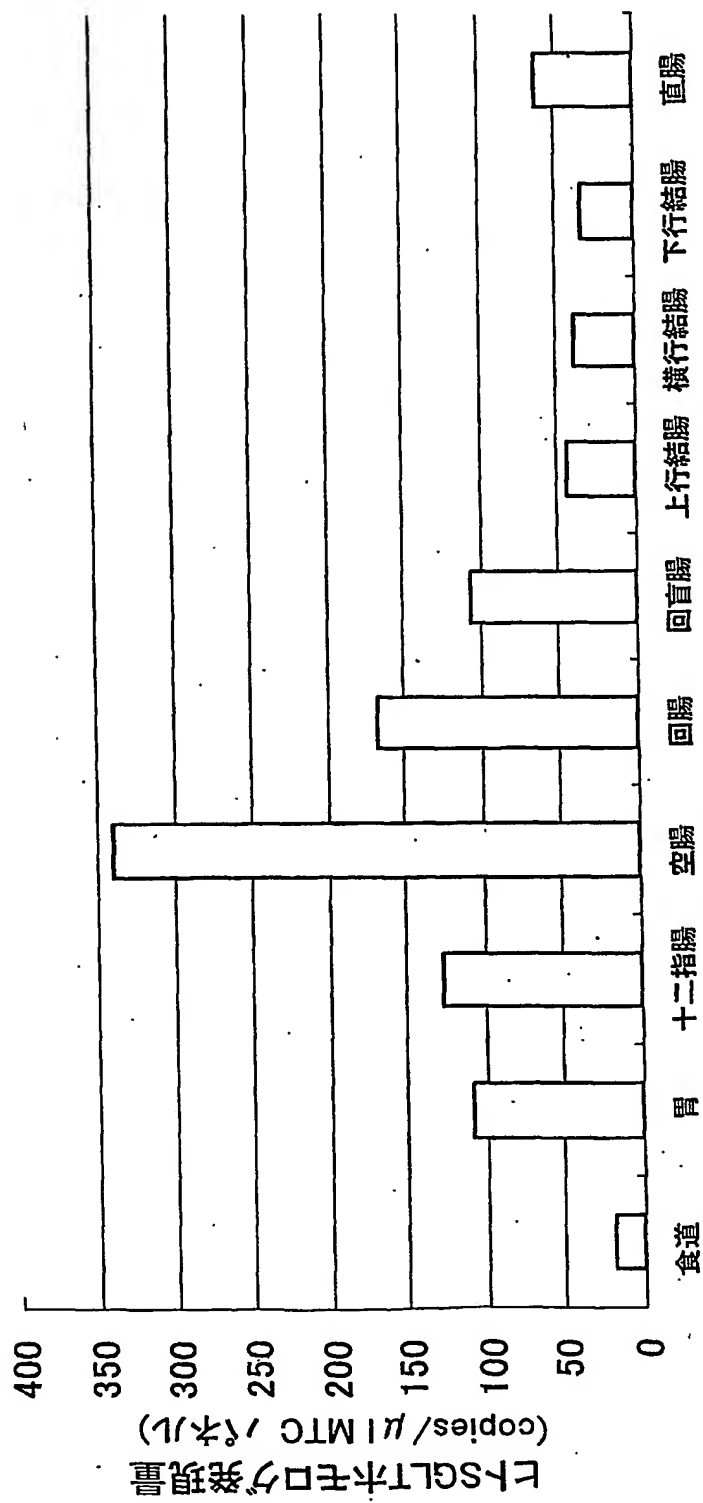
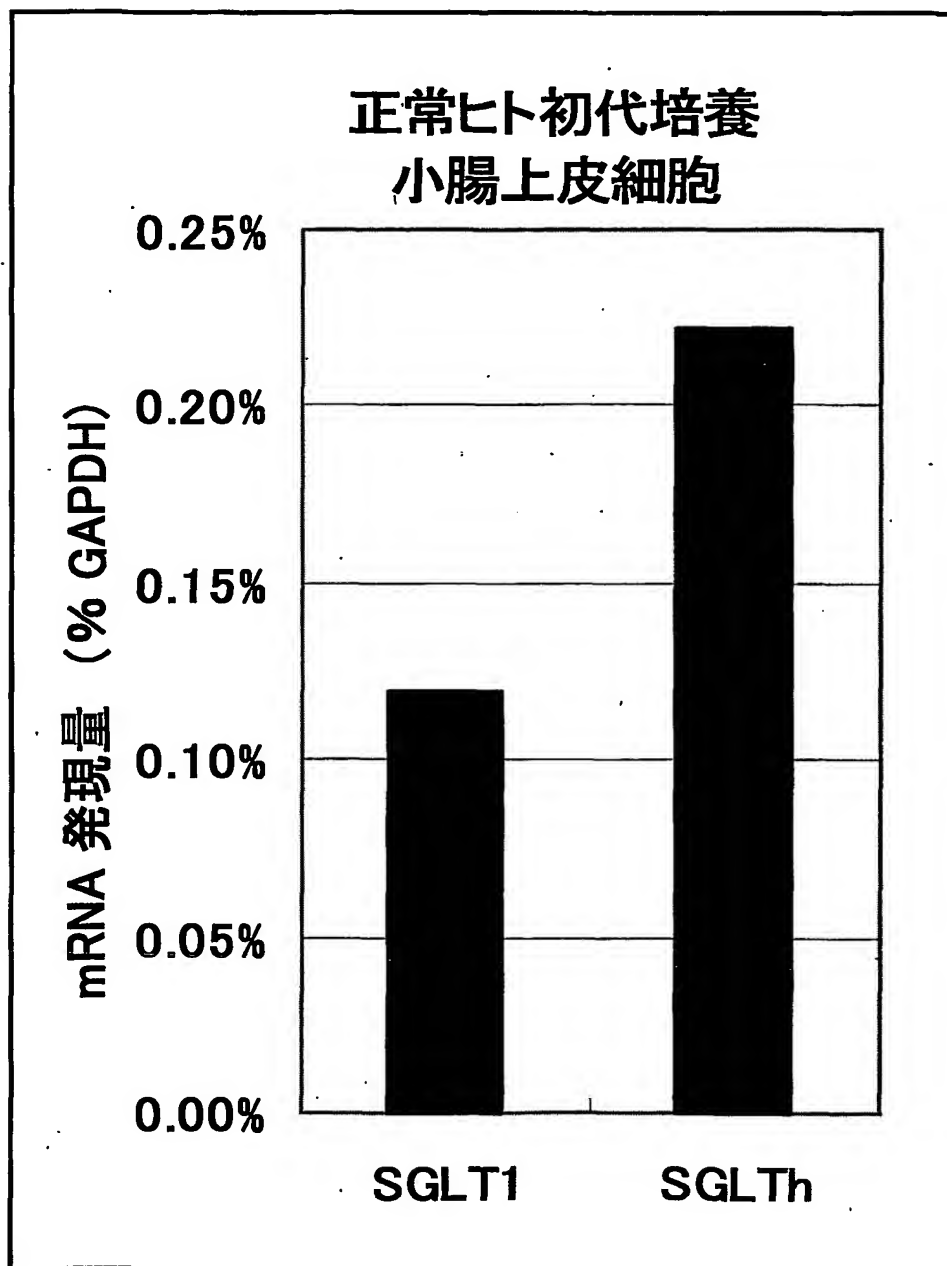


図 2

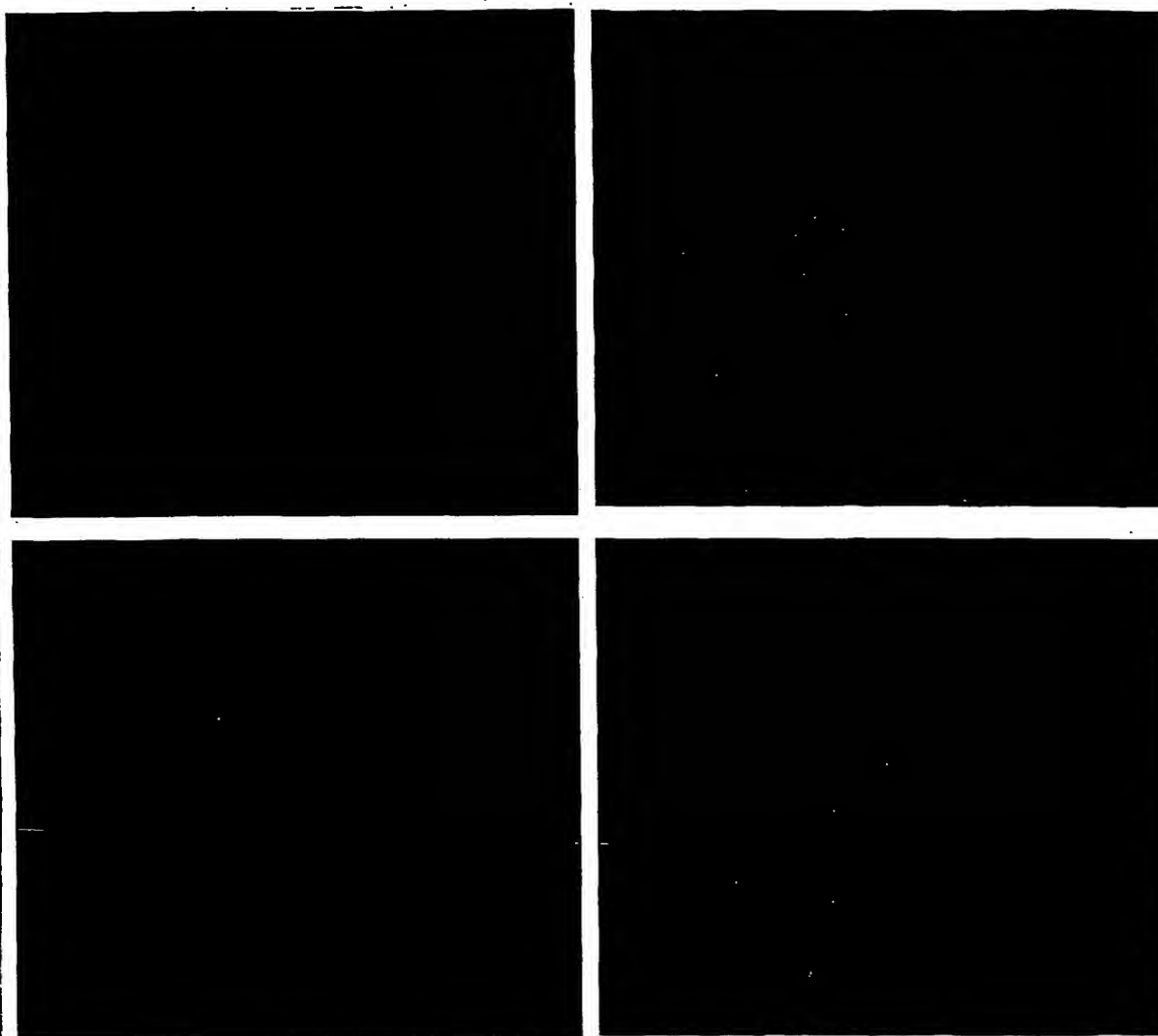


BEST AVAILABLE COPY

図 3

**Negative control
(rabbit IgG)**

SGLTh



差 替 え 用 紙 (規則26)

BEST AVAILABLE COPY

図 4

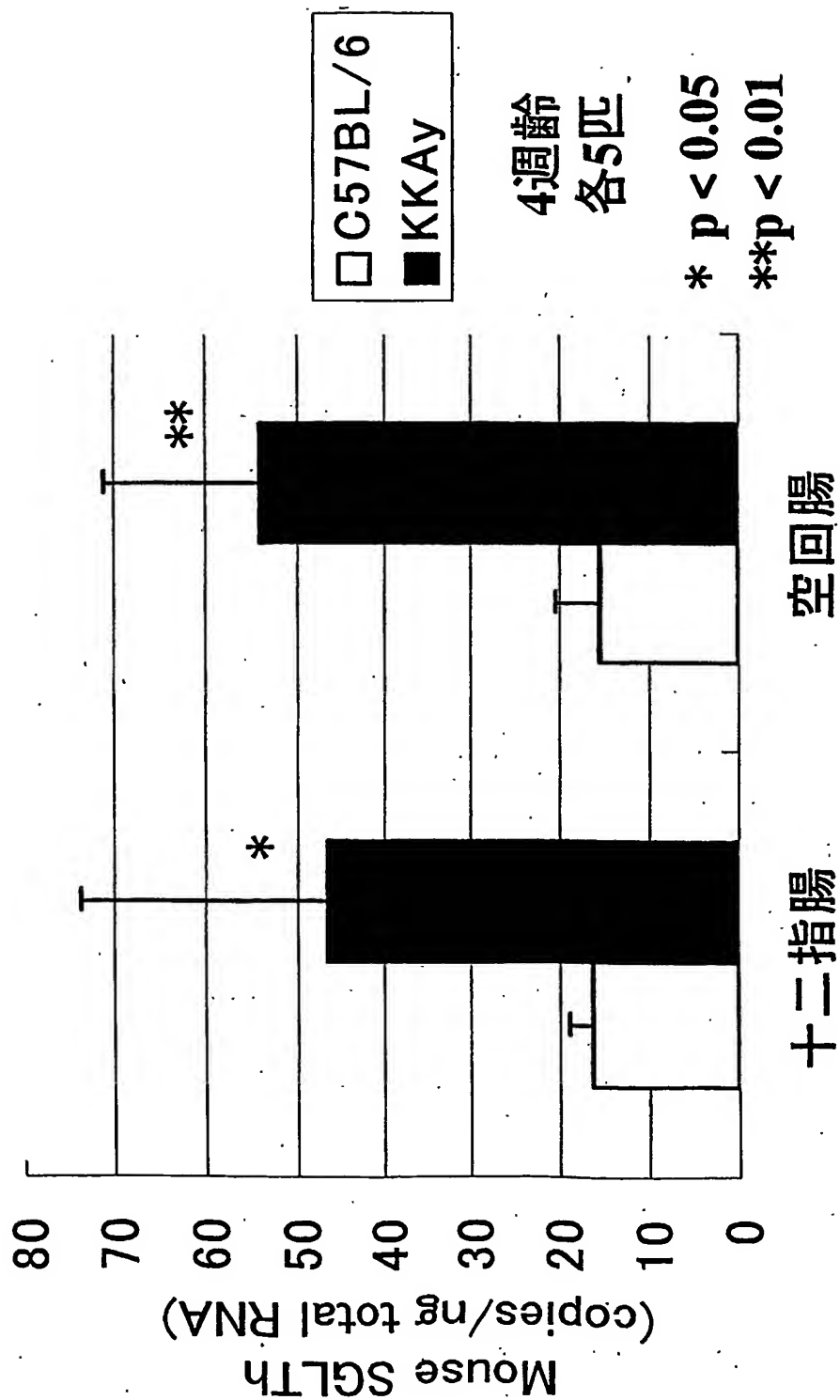


図 5

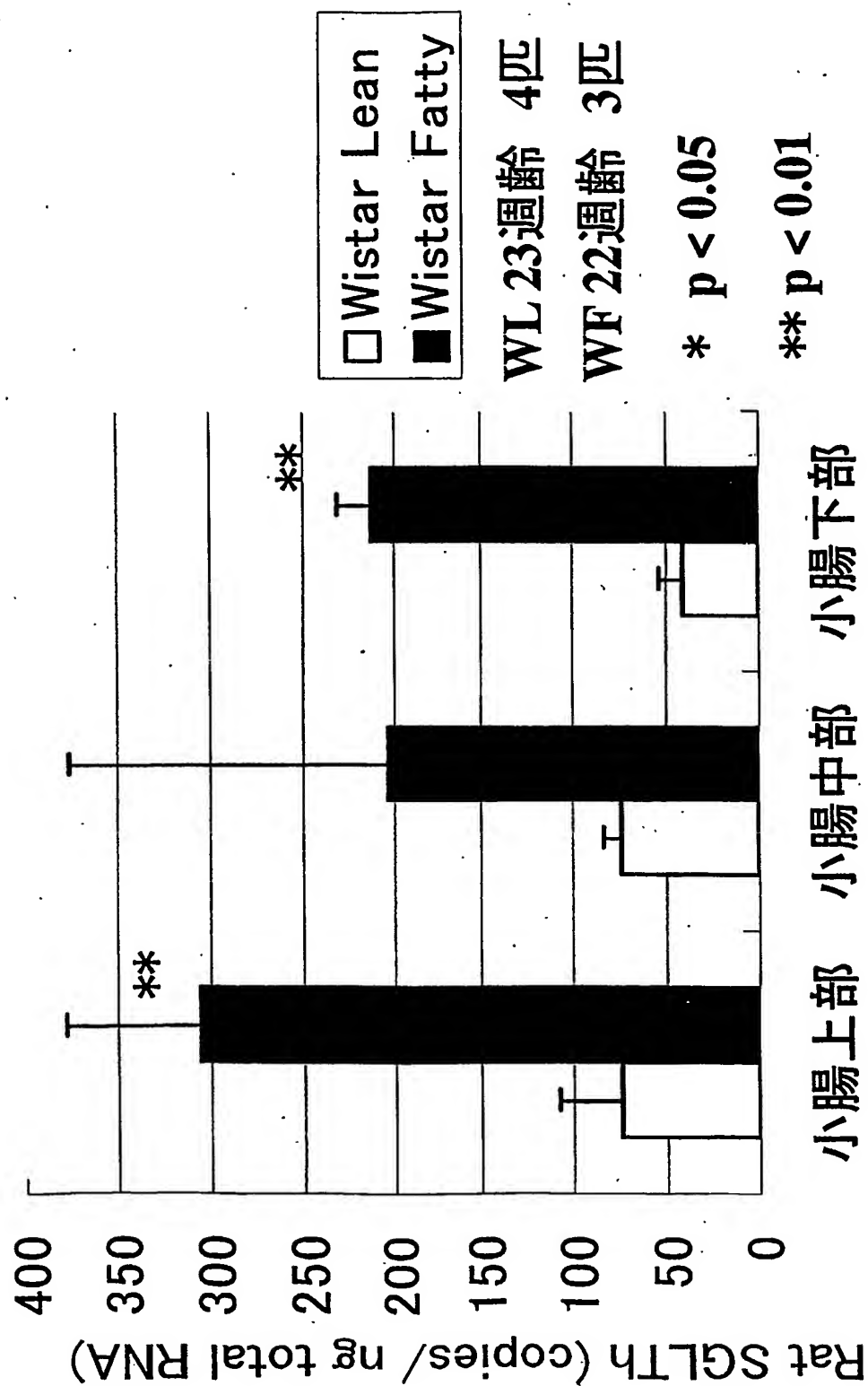
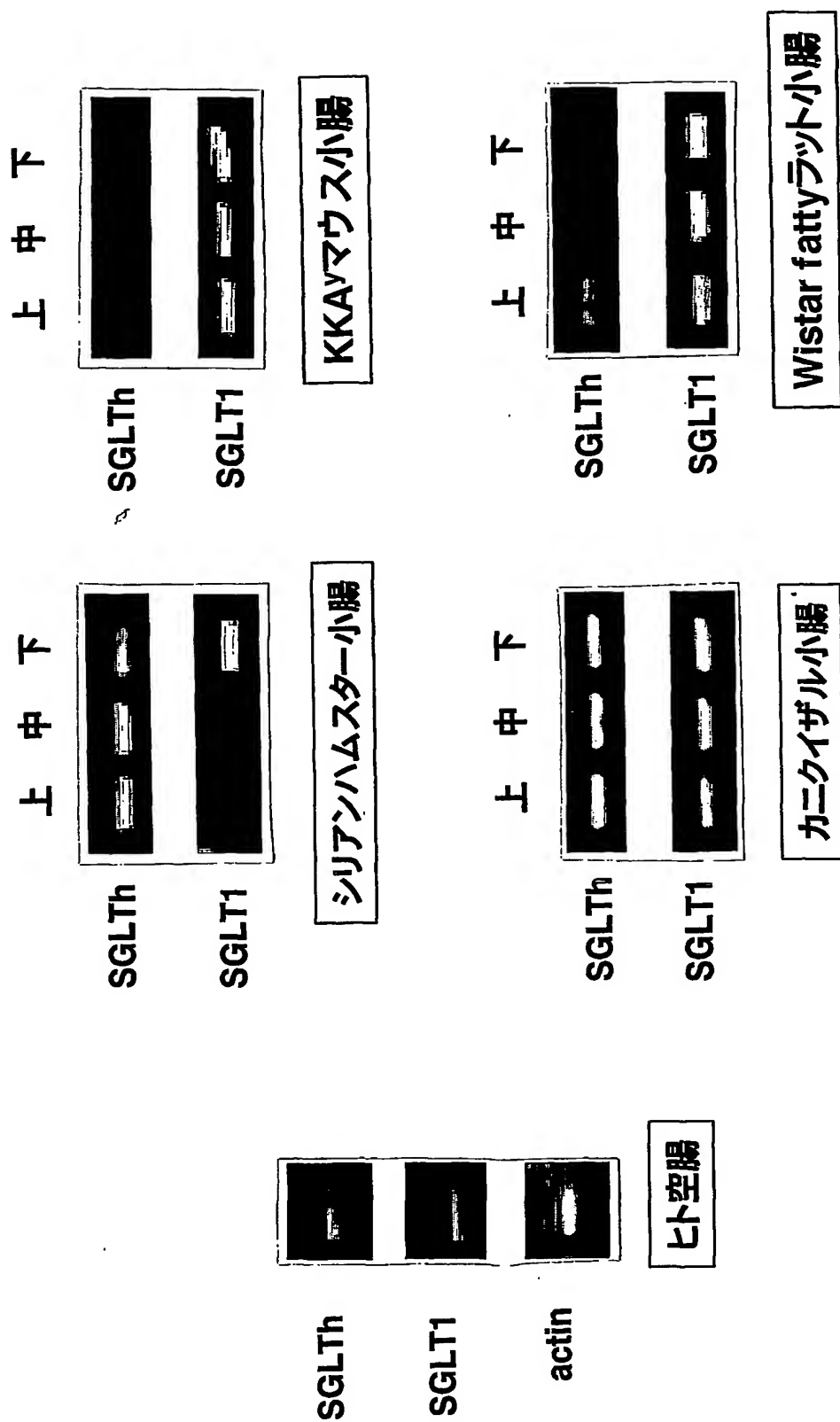


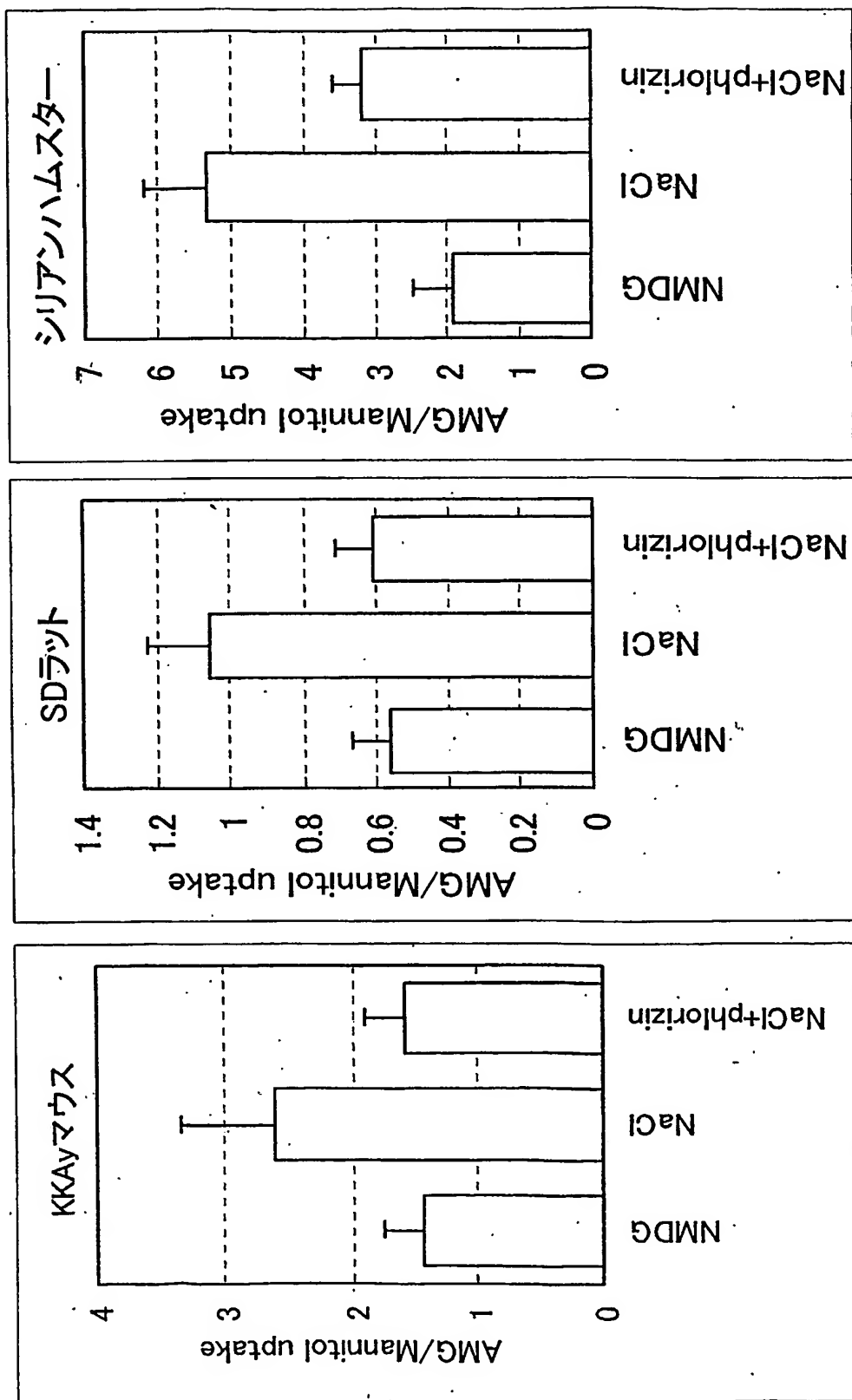
図 6



差 替 え 用 紙 (規則26)

BEST AVAILABLE COPY

図 7



SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Use of SGLT homolog

<130> 3107W00P

<150> JP 2002-314041

<151> 2002-10-29

<150> JP 2003-156306

<151> 2003-6-2

<160> 57

<210> 1

<211> 674

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

Met Gly Pro Gly Ala Ser Gly Asp Gly Val Arg Thr Glu Thr Ala Pro

5

10

15

His Ile Ala Leu Asp Ser Arg Val Gly Leu His Ala Tyr Asp Ile Ser

20

25

30

Val Val Val Ile Tyr Phe Val Phe Val Ile Ala Val Gly Ile Trp Ser

35

40

45

Ser Ile Arg Ala Ser Arg Gly Thr Ile Gly Gly Tyr Phe Leu Ala Gly

50

55

60

Arg Ser Met Ser Trp Trp Pro Ile Gly Ala Ser Leu Met Ser Ser Asn

65

70

75

80

Val Gly Ser Gly Leu Phe Ile Gly Leu Ala Gly Thr Gly Ala Ala Gly

85

90

95

Gly Leu Ala Val Gly Gly Phe Glu Trp Asn Ala Thr Trp Leu Leu Leu

2/37

100	105	110	
Ala Leu Gly Trp Val Phe Val Pro Val Tyr Ile Ala Ala Gly Val Val			
115	120	125	
Thr Met Pro Gln Tyr Leu Lys Lys Arg Phe Gly Gly Gln Arg Ile Gln			
130	135	140	
Val Tyr Met Ser Val Leu Ser Leu Ile Leu Tyr Ile Phe Thr Lys Ile			
145	150	155	160
Ser Thr Asp Ile Phe Ser Gly Ala Leu Phe Ile Gln Met Ala Leu Gly			
165	170	175	
Trp Asn Leu Tyr Leu Ser Thr Gly Ile Leu Leu Val Val Thr Ala Val			
180	185	190	
Tyr Thr Ile Ala Gly Gly Leu Met Ala Val Ile Tyr Thr Asp Ala Leu			
195	200	205	
Gln Thr Val Ile Met Val Gly Gly Ala Leu Val Leu Met Phe Leu Gly			
210	215	220	
Phe Gln Asp Val Gly Trp Tyr Pro Gly Leu Glu Gln Arg Tyr Arg Gln			
225	230	235	240
Ala Ile Pro Asn Val Thr Val Pro Asn Thr Thr Cys His Leu Pro Arg			
245	250	255	
Pro Asp Ala Phe His Met Leu Arg Asp Pro Val Ser Gly Asp Ile Pro			
260	265	270	
Trp Pro Gly Leu Ile Phe Gly Leu Thr Val Leu Ala Thr Trp Cys Trp			
275	280	285	
Cys Thr Asp Gln Val Ile Val Gln Arg Ser Leu Ser Ala Lys Ser Leu			
290	295	300	
Ser His Ala Lys Gly Gly Ser Val Leu Gly Gly Tyr Leu Lys Ile Leu			
305	310	315	320
Pro Met Phe Phe Ile Val Met Pro Gly Met Ile Ser Arg Ala Leu Phe			

3/37

325	330	335
Pro Asp Glu Val Gly Cys Val Asp Pro Asp Val Cys Gln Arg Ile Cys		
340	345	350
Gly Ala Arg Val Gly Cys Ser Asn Ile Ala Tyr Pro Lys Leu Val Met		
355	360	365
Ala Leu Met Pro Val Gly Leu Arg Gly Leu Met Ile Ala Val Ile Met		
370	375	380
Ala Ala Leu Met Ser Ser Leu Thr Ser Ile Phe Asn Ser Ser Ser Thr		
385	390	395
Leu Phe Thr Ile Asp Val Trp Gln Arg Phe Arg Arg Lys Ser Thr Glu		400
405	410	415
Gln Glu Leu Met Val Val Gly Arg Val Phe Val Val Phe Leu Val Val		
420	425	430
Ile Ser Ile Leu Trp Ile Pro Ile Ile Gln Ser Ser Asn Ser Gly Gln		
435	440	445
Leu Phe Asp Tyr Ile Gln Ala Val Thr Ser Tyr Leu Ala Pro Pro Ile		
450	455	460
Thr Ala Leu Phe Leu Leu Ala Ile Phe Cys Lys Arg Val Thr Glu Pro		
465	470	475
Gly Ala Phe Trp Gly Leu Val Phe Gly Leu Gly Val Gly Leu Leu Arg		480
485	490	495
Met Ile Leu Glu Phe Ser Tyr Pro Ala Pro Ala Cys Gly Glu Val Asp		
500	505	510
Arg Arg Pro Ala Val Leu Lys Asp Phe His Tyr Leu Tyr Phe Ala Ile		
515	520	525
Leu Leu Cys Gly Leu Thr Ala Ile Val Ile Val Ile Val Ser Leu Cys		
530	535	540
Thr Thr Pro Ile Pro Glu Glu Gln Leu Thr Arg Leu Thr Trp Trp Thr		

545 550 555 560
 Arg Asn Cys Pro Leu Ser Glu Leu Glu Lys Glu Ala His Glu Ser Thr
 565 570 575
 Pro Glu Ile Ser Glu Arg Pro Ala Gly Glu Cys Pro Ala Gly Gly Gly
 580 585 590
 Ala Ala Glu Asn Ser Ser Leu Gly Gln Glu Gln Pro Glu Ala Pro Ser
 595 600 605
 Arg Ser Trp Gly Lys Leu Leu Trp Ser Trp Phe Cys Gly Leu Ser Gly
 610 615 620
 Thr Pro Glu Gln Ala Leu Ser Pro Ala Glu Lys Ala Ala Leu Glu Gln
 625 630 635 640
 Lys Leu Thr Ser Ile Glu Glu Glu Pro Leu Trp Arg His Val Cys Asn
 645 650 655
 Ile Asn Ala Val Leu Leu Leu Ala Ile Asn Ile Phe Leu Trp Gly Tyr
 660 665 670

Phe Ala

674

<210> 2

<211> 2022

<212> DNA

<213> Human

<400> 2

atggggcctg gagcttcagg ggacggggtc aggactgaga cagctccaca catagcactg 60
 gactccagag ttggtctgca cgcctacgac atcagcgtgg tggatcatcta ctttgtcttc 120
 gtcattgctg tggggatctg gtcgtccatc cgtgcaagtc gagggaccat tggcggctat 180
 ttcttgcccg ggaggtccat gagctggtgg ccaattggag catctctgat gtccagcaat 240
 gtgggcagtg gcttgttcat cggcctggct gggacagggg ctgccggagg ccttgccgta 300
 ggtggcttcg agtgaacgc aacctggctg ctctggccc ttggctgggt ctctgtccct 360

gtgtacatcg cagcaggtgt ggtcacaatg cgcagtatc tgaagaagcg atttgggggc 420
cagaggatcc aggtgtacat gtctgtcctg tctctcatcc tctacatctt caccaagatc 480
tcgactgaca tcttctctgg agccctcttc atccagatgg cattgggctg gaacctgtac 540
ctctccacag ggatcctgct ggtggtgact gccgtctaca ccattgcagg tggcctcatg 600
gccgtgatct acacagatgc tctgcagacg gtgatcatgg tagggggagc cctggtcctc 660
atgtttctgg gctttcagga cgtgggctgg taccaggcc tggagcagcg gtacaggcag 720
gccatcccta atgtcacagt cccaacacc acctgtcacc tcccacggcc cgatgctttc 780
cacatgcttc gggaccctgt gagcggggac atcccttggc caggtctcat tttcgggctc 840
acagtgtgg ccacctgggtg ttgggtgcaca gaccaggcca ttgtgcagcg gtctctctcg 900
gccaaagtc tgtctcatgc caaggaggc tccgtgtgg ggggctacct gaagatcctc 960
cccatgttct tcatcgatc gctggcatg atcagccggg cctgtttccc agacgaggtg 1020
ggctgcgtgg acctgatgt ctgcaaaga atctgtgggg ccgagtggg atgttccaac 1080
attgcctacc ctaagttggt catggccctc atgcctgttg gtctgcgggg gctgatgatt 1140
gccgtgatca tggccgctct catgagctca ctcacctca tcttcaacag cagcagcacc 1200
ctgttcacca ttgatgtgtg gcagcgttc cgcagggaagt caacagagca ggagctgatg 1260
gtgggtgggca gagtgtttgt ggtgttctctg gttgtcatca gcatcctctg gatccccatc 1320
atccaaagct ccaacagtgg gcagctcttc gactacatcc aggtgtcac cagttacctg 1380
gccccacca tcaccgctct cttcctgctg gccatcttct gcaagagggt cacagagccc 1440
ggagctttct ggggcctcgt gtttggcctg ggagtggggc ttctgcgtat gatcctggag 1500
ttctcatacc cagcgcacgc ctgtggggag gtggaccgga ggccagcagt gctgaaggac 1560
ttccactacc tgtactttgc aatcctctc tgccgggtca ctgccatcgt cattgtcatt 1620
gtcagcctct gtacaactcc catcctgag gaacagctca cagcctcac atggtggact 1680
cggaactgcc ccctctctga gctggagaag gaggcccacg agagcacacc ggagatatcc 1740
gagaggccag ccggggagt ccctgcagga ggtggagcgg cagagaactc gagcctgggc 1800
caggagcagc ctgaagcccc aagcaggtcc tggggaaagt tgctctggag ctggttctgt 1860
gggctctctg gaacaccgga gcaggccctg agcccagcag agaaggctgc gctagaacag 1920
aagctgacaa gcattgagga ggagccactc tggagacatg tctgcaacat caatgctgtc 1980
cttttgctgg ccatcaacat cttcctctgg ggctattttg cg 2022

6/37

<210> 3

<211> 678

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 3

Met Glu Pro Gly Val Ser Arg Asn Gly Val Arg Thr Glu Thr Thr Thr
5 10 15
Asn Pro Ser Leu Gly Leu His Thr Tyr Asp Ile Val Val Val Val Ile
20 25 30
Tyr Phe Val Phe Val Leu Ala Val Gly Ile Trp Ser Ser Ile Arg Ala
35 40 45
Ser Arg Gly Thr Val Gly Gly Tyr Phe Leu Ala Gly Arg Ser Met Thr
50 55 60
Trp Trp Pro Ile Gly Ala Ser Leu Met Ser Ser Asn Val Gly Ser Gly
65 70 75 80
Leu Phe Ile Gly Leu Ala Gly Thr Gly Ala Ala Gly Gly Leu Ala Val
85 90 95
Gly Gly Phe Glu Trp Asn Ala Thr Phe Leu Leu Leu Ala Leu Gly Trp
100 105 110
Ile Phe Val Pro Val Tyr Ile Ala Ala Gly Val Val Thr Met Pro Gln
115 120 125
Tyr Leu Lys Lys Arg Phe Gly Gly Gln Arg Ile Gln Val Tyr Met Ser
130 135 140
Val Leu Ser Leu Ile Leu Tyr Ile Phe Thr Lys Ile Ser Thr Asp Ile
145 150 155 160
Phe Ser Gly Ala Leu Phe Ile Gln Met Ala Leu Gly Trp Asn Leu Tyr
165 170 175
Leu Ser Thr Val Ile Leu Leu Val Val Thr Ala Val Tyr Thr Ile Ala

7/37

180 185 190
Gly Gly Leu Thr Ala Val Ile Tyr Thr Asp Ala Leu Gln Thr Val Ile
195 200 205
Met Val Gly Gly Ala Leu Val Leu Met Phe Leu Gly Phe Gln Glu Val
210 215 220
Gly Trp Tyr Pro Gly Leu Gln Gln Leu Tyr Arg Gln Ala Ile Pro Asn
225 230 235 240
Thr Thr Val Pro Asn Thr Thr Cys His Leu Pro Arg Pro Asp Ala Phe
245 250 255
His Met Leu Arg Asp Pro Val Asn Gly Asp Ile Pro Trp Pro Gly Leu
260 265 270
Ile Phe Gly Leu Thr Val Leu Ala Thr Trp Cys Trp Cys Thr Asp Gln
275 280 285
Val Ile Val Gln Arg Ser Leu Ala Ala Lys Asn Leu Ser His Ala Lys
290 295 300
Gly Gly Ser Val Leu Gly Gly Tyr Leu Lys Ile Leu Pro Met Phe Phe
305 310 315 320
Ile Val Met Pro Gly Met Ile Ser Arg Ala Leu Tyr Pro Asp Glu Val
325 330 335
Ala Cys Val Asp Pro Asp Ile Cys Gln Arg Val Cys Gly Ala Arg Val
340 345 350
Gly Cys Ser Asn Ile Ala Tyr Pro Lys Leu Val Met Ala Leu Met Pro
355 360 365
Val Gly Leu Arg Gly Leu Met Ile Ala Val Ile Met Ala Ala Leu Met
370 375 380
Ser Ser Leu Thr Ser Ile Phe Asn Ser Ser Ser Thr Leu Phe Ala Ile
385 390 395 400
Asp Val Trp Gln Arg Phe Arg Arg Gln Ala Ser Glu Gln Glu Leu Met

8/37

405	410	415
Val Val Gly Arg Leu Phe Val Val Phe Leu Val Val Ile Ser Ile Leu		
420	425	430
Trp Ile Pro Ile Ile Gln Ser Ser Asn Ser Gly Gln Leu Phe Asp Tyr		
435	440	445
Ile Gln Ser Ile Thr Ser Tyr Leu Ala Pro Pro Ile Thr Ala Leu Phe		
450	455	460
Leu Leu Ala Ile Phe Cys Lys Arg Val Asn Glu Pro Gly Ala Phe Trp		
465	470	475
Gly Leu Met Phe Gly Leu Val Val Gly Ile Leu Arg Met Ile Leu Glu		
485	490	495
Phe Ser Tyr Ser Ala Pro Ala Cys Gly Glu Met Asp Arg Arg Pro Ala		
500	505	510
Val Leu Lys Asp Phe His Tyr Leu Tyr Phe Ala Leu Leu Leu Cys Gly		
515	520	525
Leu Thr Ala Ile Ile Ile Val Val Ile Ser Phe Phe Thr Glu Pro Ile		
530	535	540
Pro Asp Asp Lys Leu Ala Arg Leu Thr Trp Trp Thr Arg Asn Cys Ala		
545	550	555
Val Ser Asp Leu Gln Lys Lys Thr Ser Val Ser Val Asn Asn Thr Glu		
565	570	575
Asp Asp Asn Ser Pro Gly Leu Ala Gly Arg Pro Val Val Glu Gly Pro		
580	585	590
Ala Gly Asp Glu Glu Glu Ala Asn Thr Thr Gln Gly Pro Glu Gln Pro		
595	600	605
Gly Ala Leu His Arg Ser Trp Gly Lys Trp Leu Trp Asn Trp Phe Cys		
610	615	620
Gly Leu Ser Gly Ala Pro Gln Gln Ala Leu Ser Pro Ala Glu Lys Ala		

9/37

625 630 635 640
 Val Leu Glu Gln Lys Leu Thr Ser Ile Glu Glu Glu Pro Leu Trp Arg
 645 650 655
 Arg Val Cys Asn Ile Asn Ala Ile Ile Leu Leu Ala Ile Asn Ile Phe
 660 665 670
 Leu Trp Gly Tyr Phe Ala
 675 678

<210> 4

<211> 2034

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 4

```

atggaaccag gagtgtcaag gaatggagtc agaactgaga caacaacgaa cccaagcctg      60
gggctacata cctatgacat cgtgggtggtg gtcaictatt ttgtctttgt tcttgetgtg      120
ggaatttggg catccatccg tgcaagtcga gggaccgttg gtggctatit cctggctggg      180
agatccatga cctgggtggc aattggagca tctctaattg ccagcaatgt gggcagtggc      240
ttatttatcg gcctggctgg aacaggggct gctggaggac ttgctgttgg tggctttgag      300
tggaacgcaa ccttcctgct tctagccctg ggctggatct ttgtccctgt gtacatagca      360
gctgggtgtg tcacatgcc acagtacctg aagaaacgat ttgggggaca gaggatccag      420
gtgtacatgt cagttctttc tctcatcctc tacatcttca ccaagatatc gactgatatc      480
ttctctggag ccctcttcat ccagatggcc ttgggctgga atctctatct ctccacagtc      540
atcttgctgg tggtagacag tgtctacacc attgcagggg gcctcacagc tgtgatctac      600
acagatgctc tacagactgt gatcatggtt gggggagctc tggtcctcat gtttctgggc      660
tttcaggagg ttggctggta ccagggcctg cagcagctct atagacaggc catccccaat      720
accacagttc ccaataccac ctgtcacctc ccacggcctg atgccttcca catgcttcga      780
gatcctgtga atggagacat cccctggcca ggtctcattt ttggcctcac agtcttggcc      840
acctgggtgtt ggtgcacaga ccaggtgatt gtgcagaggt ctctcgcagc caagaatctt      900
tcacatgcca agggaggctc cgtgctaggg ggctacctaa agatcctccc aatgttcttc      960

```

10/37

attgtcatgc ctggcatgat cagcagggcc ctgtaccag atgaagttgc ctgtgtggac 1020
cctgacatct gtcaaagagt gtgtggggcc agagttggat gctccaatat tgcctacccc 1080
aagctgggta tggtctcat gcctgtgggg ctgcgaggcc tgatgattgc tgtgatcatg 1140
gctgccctca tgagctcact cacctctatc ttcaacagca gtagcaccct gtttgccata 1200
gatgtgtggc agcgcttccg caggcaggca tcggagcaag agctgatggg ggtaggcagg 1260
ttgttcgtag tcttcctggg agtcatcagc atcctctgga tccccatcat ccagagctcc 1320
aatagtgggc agctctttga ctacatccaa tctatcacca gctacttagc cccacccatc 1380
acagccctct tcctgctggc tatcttctgc aagaggggtca acgagcctgg tgccttctgg 1440
ggcctcatgt ttggcctggg cgtcggaata ctgcgtatga ttctggagtt ctcatactcg 1500
gccccagcct gtggggagat ggacaggcgg ccagctgttc tgaaggactt ccactacctg 1560
tactttgccc ttctcctctg tggactgacc gcgatcatca ttgtcgtaat cagcttcttc 1620
acggagccca tccccgatga caagcttgct cgcctgacct ggtggacaag gaactgtgcc 1680
gtatctgacc tgcagaagaa aacctctgtg agtgtgaaca acacagagga tgacaactct 1740
ccaggactgg cagggaggcc agtggttagag ggccctgcag gagatgagga agaagcaaac 1800
accactcagg ggcctgaaca accaggagcc ctacacaggt cctggggaaa atggctgtgg 1860
aactggttct gcggactctc aggagcccca cagcaagccc tgagcccagc tgagaaggct 1920
gtgttgagc agaagctgac cagcatcgag gaggagccgc tctggagacg tgtctgcaac 1980
atcaacgcca tcctcctgct agccatcaac atctttctct ggggctatct tgcg 2034

<210> 5

<211> 681

<212> PRT

<213> Rat

<400> 5

Met Glu Pro Gly Ala Ser Arg Asp Gly Leu Arg Ala Glu Thr Thr His

5

10

15

Gln Ala Leu Gly Ser Gly Val Ser Leu His Thr Tyr Asp Ile Val Val

20

25

30

Val Val Ile Tyr Phe Val Phe Val Leu Ala Val Gly Ile Trp Ser Ser

11/37

35	40	45	
Ile Arg Ala Ser Arg Gly Thr Ile Gly Gly Tyr Phe Leu Ala Gly Arg			
50	55	60	
Ser Met Thr Trp Trp Pro Ile Gly Ala Ser Leu Met Ser Ser Asn Val			
65	70	75	80
Gly Ser Gly Leu Phe Ile Gly Leu Ala Gly Thr Gly Ala Ala Gly Gly			
85	90	95	
Leu Ala Val Gly Gly Phe Glu Trp Asn Ala Thr Phe Leu Leu Leu Ala			
100	105	110	
Leu Gly Trp Ile Phe Val Pro Val Tyr Ile Ala Ala Gly Val Val Thr			
115	120	125	
Met Pro Gln Tyr Leu Lys Lys Arg Phe Gly Gly Gln Arg Ile Gln Val			
130	135	140	
Tyr Met Ser Val Leu Ser Leu Ile Leu Tyr Ile Phe Thr Lys Ile Ser			
145	150	155	160
Thr Asp Ile Phe Ser Gly Ala Leu Phe Ile Gln Met Ala Leu Gly Trp			
165	170	175	
Asn Leu Tyr Leu Ser Thr Val Ile Leu Leu Val Val Thr Ala Val Tyr			
180	185	190	
Thr Ile Ala Gly Gly Leu Thr Ala Val Ile Tyr Thr Asp Ala Leu Gln			
195	200	205	
Thr Val Ile Met Val Gly Gly Ala Leu Val Leu Met Phe Leu Gly Phe			
210	215	220	
Arg Glu Val Gly Trp Tyr Pro Gly Leu Gln Gln Leu Tyr Arg Gln Ser			
225	230	235	240
Ile Pro Asn Val Thr Val Pro Asn Thr Thr Cys His Leu Pro Arg Ser			
245	250	255	
Asp Ala Phe His Met Leu Arg Asp Pro Val Asn Gly Asp Ile Pro Trp			

12/37

260	265	270
Pro Gly Leu Ile Phe Gly Leu Thr Val Leu Ala Thr Trp Cys Trp Cys		
275	280	285
Thr Asp Gln Val Ile Val Gln Arg Ser Leu Ser Ala Lys Ser Leu Ser		
290	295	300
His Ala Lys Gly Gly Ser Val Leu Gly Gly Tyr Leu Lys Ile Leu Pro		
305	310	315
Met Phe Phe Ile Val Met Pro Gly Met Ile Ser Arg Ala Leu Tyr Pro		
325	330	335
Asp Glu Val Ala Cys Val Asp Pro Asp Ile Cys Gln Arg Val Cys Gly		
340	345	350
Ala Arg Val Gly Cys Ser Asn Ile Ala Tyr Pro Lys Leu Val Met Ala		
355	360	365
Leu Met Pro Val Gly Leu Arg Gly Leu Met Ile Ala Val Ile Met Ala		
370	375	380
Ala Leu Met Ser Ser Leu Thr Ser Ile Phe Asn Ser Ser Ser Thr Leu		
385	390	395
Phe Ala Ile Asp Val Trp Gln Arg Val Arg Arg Gln Ala Ser Glu Gln		
405	410	415
Glu Leu Met Val Val Gly Arg Leu Phe Val Val Phe Leu Val Leu Ile		
420	425	430
Ser Ile Leu Trp Ile Pro Ile Ile Gln Ser Ser Asn Ser Gly Gln Leu		
435	440	445
Phe Asp Tyr Ile Gln Ser Ile Thr Ser Tyr Leu Ala Pro Pro Ile Thr		
450	455	460
Ala Leu Phe Leu Leu Ala Ile Phe Cys Lys Arg Val Thr Glu Pro Gly		
465	470	475
Ala Phe Trp Gly Leu Met Phe Gly Leu Val Val Gly Ile Leu Arg Met		

13/37

485	490	495
Ile Leu Glu Phe Ser Tyr Ser Ala Pro Ala Cys Gly Glu Lys Asp Arg		
500	505	510
Arg Pro Ala Val Leu Lys Asp Phe His Tyr Leu Tyr Phe Ala Leu Leu		
515	520	525
Leu Cys Gly Leu Thr Ala Ile Ile Ile Val Ile Ile Ser Phe Phe Thr		
530	535	540
Glu Pro Ile Pro Asp Glu Lys Leu Ala Arg Leu Thr Trp Trp Thr Arg		
545	550	555
Ser Cys Pro Ile Ser Glu Leu Gln Lys Lys Val Ser Val Ser Val Asn		
565	570	575
Asn Thr Glu Ser Asp Asn Ser Pro Ala Leu Ala Gly Arg Pro Val Met		
580	585	590
Glu Gly Thr Ala Gly Asp Glu Glu Glu Ala Asn Thr Thr Ser Glu Pro		
595	600	605
Glu Gln Pro Glu Val Leu His Arg Ser Trp Gly Lys Trp Leu Trp Asn		
610	615	620
Trp Phe Cys Gly Leu Ser Gly Thr Pro Gln Gln Ala Leu Ser Pro Ala		
625	630	635
Glu Lys Ala Glu Leu Glu Gln Lys Leu Thr Ser Ile Glu Glu Glu Pro		
645	650	655
Leu Trp Arg Cys Val Cys Asn Ile Asn Ala Ile Ile Leu Leu Ala Ile		
660	665	670
Asn Ile Phe Leu Trp Gly Tyr Phe Ala		
675	680	681

<210> 6

<211> 2043

<212> DNA

<213> Rat

<400> 6

atggaacctg gagcttcaag ggatggactc agagctgaga caacacacca agccctgggc 60
tctggagtca gcctgcacac ctatgacatc gtggtgggtg tcatctactt tgtctttgtc 120
cttgctgtgg gaatttggtc gtccatccgc gcaagccgag ggaccattgg tggctatttc 180
ctggctggaa gatccatgac ctggtggcca attggagcat ctctaattgc cagcaatgtg 240
ggcagtggct tattcatcgg cctggctgga acaggggctg ctggaggcct tgctgtgggt 300
ggcttcgagt ggaatgcaac ttttctgctt ctggccctgg gctggatctt tgtccctgtg 360
tacatcgag ctggtgtggt caccatgcca cagtacctga agaaacgatt tggggggcag 420
aggatccagg tgtacatgtc agtcctgtct ctcatactct acatcttcac caagatatcg 480
actgatatct tctctggagc cctcttcac cagatggcct tgggctggaa tctctatctc 540
tccacagtca tcctgctggt ggtgacagct gtctacacca ttgcaggggg cctcacagct 600
gtgatctaca cagatgctct acagaccgtg atcatggttg ggggagccct ggtcctcatg 660
tttctgggct ttcgggaggt cggctggtac ccaggcttgc agcagctcta tagacagtc 720
atccccaatg tcacagttcc caacactacc tgtcacctcc cacggtctga tgccttcac 780
atgcttcgag atcctgtgaa cggggacatc ccctggccag gtcttatttt tggcctcaca 840
gtcttggcca cctggtgttg gtgcacggac caggtgattg tgcagaggtc tctctcgcc 900
aagagtcttt cacatgccaa gggaggatca gtgttagggg gctacctaaa gatcctccca 960
atgttcttca ttgtcatgcc cggcatgac agcagggccc tgtaccaga tgaagtcgcc 1020
tgtgtggacc ctgacatctg tcagagagtg tgtggggcca gagttggatg ctccaatatt 1080
gcctacccca aacttgttat ggctctcatg cctgtgggtc tgcgaggcct gatgattgcc 1140
gtgatcatgg ctgccctcat gagctcactc acctccatct tcaacagcag tagcaccctg 1200
tttgccatag atgtgtggca gcgagtcgc aggcaggcat cggagcaaga gctgatgggtg 1260
gtaggcaggt tgtttgtagt cttcctggta ctcatcagca tcctctggat ccccatcact 1320
cagagctcca atagtgggca gctctttgac tacatccaat ccatcaccag ctacctagcc 1380
ccgcccata cagccctctt cctgctggcc atcttctgca agagggtcac tgagcctgggt 1440
gccttctggg gcctcatgtt tggcctggta gtgggaatac tgcgtatgat tctggagtgc 1500
tcatactcag cccagcctg tggggagaag gacaggcggc cagctgttct taaggacttc 1560

15/37

cactacctgt actttgccct cctcctctgt ggacttacgg ccatcatcat tgtcataatc 1620
agctttcttca cggagcccat ccccgacgaa aagcttgctc gcctgacctg gtggacaagg 1680
agctgtccca tatctgaact acagaagaaa gtctctgtga gtgtgaacaa cacagagagt 1740
gacaactctc cagcactggc agggaggcca gtgatggagg gcactgcagg agatgaggaa 1800
gaagcaaaca ccacctcaga gcctgaacaa ccagaagtcc tacacaggtc ctgggggaaa 1860
tggtgtgga actggttctg cggactctct ggaacaccac agcaagcact gagcccagct 1920
gagaaggctg agctggagca gaagctgacc agcatcgagg aagagccact ctggagatgt 1980
gtctgcaaca tcaatgcat catcctgtg gccatcaaca tctttctctg gggctatttt 2040
gcg 2043

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 7

cccgatgctt tccacatgct tc 22

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 8

acaatgacct ggtctgtgca cc 22

<210> 9

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 9

acatcccttg gccaggtctc attttcgg

28

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 10

gggggccaga ggatccaggt gta

23

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 11

gcaatcatca gccccgcag ac

22

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 12

agcaccctct tcaccatgga

20

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 13

aaacaacctt ccggcaatca t

21

<210> 14

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 14

ccaaggtccg caagagagca tctga

25

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 15

tgtgtcgtcc cttcagaatg tg

22

<210> 16

<211> 27

<212> DNA

18/37

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 16

agaactagtt caggcaaaat atgcatg

27

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

<213> Human

<400> 17

His Asn Leu Arg Asp Pro Val Ser Gly Asp Ile Pro Trp Gly Cys

5

10

15

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 18

tgcacagacc aggtgattgt g

21

<210> 19

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 19

gcacggagcc tcccttg

17.

19/37

<210> 20

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 20

ctcgcagcca acaatctttc acatg

25

<210> 21

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 21

atctctaag tccagcaatg tg

22

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 22

accagcttgg ggtaggcaat

20

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20/37

<220>

<223> Primer

<400> 23

ctcacagtct tggccacctg

20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 24

agaaccggct ctctctggag

20

<210> 25

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe

<400> 25

tgcacggacc aggtgattgt gc

22

<210> 26

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 26

tctggagtca gcctgcacac ct

22

<210> 27

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 27

cagccttctc agctgggctc ag

22

<210> 28

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 28

gggggccaga ggatccaggt gta

23

<210> 29

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 29

aaaatagccc cagaggaaga tgttga

26

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 30

atcctgactg ggtttgcttt

20

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 31

atgctgatgc caatcagcac

20

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 32

agagctacga gctgcctgac

20

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 33

acatctgctg gaaggtggac

20

<210> 34

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 34

tgccacagta cttgaagaaa cgat

24

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 35

tgaagaacat tgggaggatt

20

<210> 36

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 36

caatgaagta ggagggtatg agg

23

<210> 37

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 37

tggcgcgtgtt gaagatggag gtc

23

<210> 38

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 38

atctctaattg tccagcaattg tg

22

<210> 39

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 39

gcaatcatca gccccögcag ac

22

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 40

atcctgactg ggtttgcttt

20

25/37

<210> 41

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 41

atgctgatgc caatcagcac

20

<210> 42

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 42

ggcaatggaa ccaggagtgt c

21

<210> 43

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 43

tcacgcaaaa tagccccaga gaaag

25

<210> 44

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

26/37

<220>

<223> Primer

<400> 44

atggacagta gcaccttgag cc

22

<210> 45

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 45

tcaggcaaaa taggcatggc ag

22

<210> 46

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 46

caatggaacc tggagcttca ag

22

<210> 47

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 47

tcacgcaaaa tagccccaga gaaag

25

27/37

<210> 48

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 48

atggacagta gcaccttgag cc

22

<210> 49

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 49

tcaggcaaaa taggcgtggc ag

22

<210> 50

<211> 681

<212> PRT

<213> Hamster

<400> 50

Met Glu Pro Gly Asp Ser Gly Asp Ala Val Ser Ala Glu Ala Ala Pro

5

10

15

His Leu Ala Leu Asp Ser Gly Val Ser Leu His Ala Tyr Asp Ile Leu

20

25

30

Val Val Val Ile Tyr Phe Val Phe Val Leu Ala Val Gly Ile Trp Ser

35

40

45

Ser Val Arg Ala Ser Arg Gly Thr Ile Gly Gly Tyr Phe Leu Ala Gly

28/37

50	55	60	
Arg Ser Met Thr Trp Trp Pro Ile Gly Ala Ser Leu Met Ser Ser Asn			
65	70	75	80
Val Gly Ser Gly Leu Phe Ile Gly Leu Ala Gly Thr Gly Ala Ala Gly			
85	90	95	
Gly Leu Ala Val Gly Gly Phe Glu Trp Asn Ala Thr Trp Leu Leu Leu			
100	105	110	
Ala Leu Gly Trp Ile Phe Val Pro Val Tyr Ile Ala Ala Gly Val Val			
115	120	125	
Thr Met Pro Gln Tyr Leu Lys Lys Arg Phe Gly Gly Gln Arg Ile Gln			
130	135	140	
Val Tyr Met Ser Val Leu Ser Leu Ile Leu Tyr Ile Phe Thr Lys Ile			
145	150	155	160
Ser Thr Asp Ile Phe Ser Gly Ala Ile Phe Ile Gln Met Ala Leu Gly			
165	170	175	
Trp Asn Leu Tyr Leu Ser Thr Val Ile Leu Leu Val Val Thr Ala Val			
180	185	190	
Tyr Thr Ile Ala Gly Gly Leu Thr Ala Val Ile Tyr Thr Asp Ala Leu			
195	200	205	
Gln Thr Val Ile Met Val Gly Gly Ala Leu Val Leu Met Phe Leu Gly			
210	215	220	
Phe Gln Glu Val Gly Trp Tyr Pro Gly Leu Gln Gln Leu Tyr Lys Gln			
225	230	235	240
Ala Ile Pro Asn Val Thr Val Pro Asn Thr Thr Cys His Leu Pro Arg			
245	250	255	
Pro Asp Ala Phe His Met Leu Arg Asp Pro Val Asn Gly Asp Ile Pro			
260	265	270	
Trp Pro Gly Leu Ile Phe Gly Leu Thr Val Leu Ala Thr Trp Cys Trp			

29/37

275	280	285
Cys Thr Asp Gln Val Ile Val Gln Arg Ser Leu Ser Ala Lys Ser Leu		
290	295	300
Ser His Ala Lys Gly Gly Ser Val Leu Gly Gly Tyr Leu Lys Ile Leu		
305	310	315
Pro Met Phe Phe Ile Val Met Pro Gly Met Ile Ser Arg Ala Leu Tyr		
325	330	335
Pro Asp Glu Val Ala Cys Val Asn Pro Asp Ile Cys Gln Arg Val Cys		
340	345	350
Gly Ala Arg Val Gly Cys Ser Asn Ile Ala Tyr Pro Lys Leu Ile Met		
355	360	365
Ala Leu Met Pro Val Gly Leu Arg Gly Leu Met Ile Ala Val Ile Met		
370	375	380
Ala Ala Leu Met Ser Ser Leu Thr Ser Ile Phe Asn Ser Ser Ser Thr		
385	390	395
Leu Phe Val Ile Asp Val Trp Gln Arg Phe Arg Lys Gln Ala Thr Glu		
405	410	415
Gln Glu Leu Met Val Val Gly Arg Leu Phe Ile Val Phe Leu Val Val		
420	425	430
Ile Ser Ile Leu Trp Ile Pro Ile Ile Gln Ser Ser Asn Ser Gly Gln		
435	440	445
Leu Phe Asp Tyr Ile Gln Ser Ile Thr Ser Tyr Leu Ala Pro Pro Ile		
450	455	460
Thr Ala Leu Phe Leu Leu Ala Ile Phe Ser Lys Arg Val Thr Glu Pro		
465	470	475
Gly Ala Phe Trp Gly Leu Thr Leu Gly Leu Ala Val Gly Ile Val Arg		
485	490	495
Met Ile Leu Glu Phe Ser Tyr Pro Ala Pro Ala Cys Gly Glu Met Asp		

30/37

500	505	510
Arg Arg Pro Ala Val Leu Arg Asp Val His Tyr Leu Tyr Phe Ala Leu		
515	520	525
Leu Leu Cys Gly Leu Ser Ala Ile Ile Thr Val Ile Ile Ser Phe Cys		
530	535	540
Thr Glu Pro Ile Pro Asp Glu Lys Leu Ala Arg Leu Thr Trp Trp Thr		
545	550	555
Arg Asn Cys Pro Leu Pro Glu Val Glu Lys Arg Ala Ser Val Ser Gly		
565	570	575
Asp Met Glu Gly Glu Asn Thr Pro Gly Leu Ala Gly Thr Pro Ala Val		
580	585	590
Glu Gly Pro Ser Gly Asp Gly Glu Glu Ala Arg Pro Thr Gln Gly Pro		
595	600	605
Glu Lys Pro Arg Ala Gln His Arg Ser Trp Gly Lys Trp Leu Trp Ser		
610	615	620
Trp Phe Cys Gly Leu Ser Gly Ala Pro Gln Gln Ala Leu Ser Ala Ala		
625	630	635
Glu Lys Ala Ala Leu Glu Lys Lys Leu Thr Ser Ile Glu Glu Glu Pro		
645	650	655
Leu Trp Arg His Val Cys Asn Ile Asn Ala Ile Ile Leu Leu Ala Ile		
660	665	670
Asn Ile Phe Leu Trp Gly Tyr Phe Ala		
675	680	

<210> 51

<211> 2046

<212> DNA

<213> Hamster

<400> 51

atggagcctg gagattcagg ggatgcagtc agcgctgagg cagcaccaca cttggcactg 60
gactctggag tcagcctgca tgcctatgac atcctgggtg tggatcatcta ctttgtcttc 120
gtccttgctg tggggatctg gtcattctgtc cgtgcaagca gagggaccat tgggtggctat 180
ttcctggctg ggagatccat gacttgggtg ccaatcggag catcgctgat gtccagcaat 240
gtgggcagtg gcttgttcat cggcctggct gggacagggg ctgctggagg ctttgccttg 300
ggtggcttcg agtggaatgc aacctggctg ctcttggctc tgggctggat ctttgtccct 360
gtgtacatcg ctgctgggtg ggtcaccatg ccacagtact tgaagaaacg atttggagga 420
cagaggatcc aggtgtatat gtcagtcctg tctctcatcc tctacatctt caccaagata 480
tcgactgaca tcttctctgg agcaatcttt atccagatgg ccttaggttg gaacctctat 540
ctctccacag tgatcttgct ggtgggtgaca gctgtctaca ccattgcagg agggctcact 600
gctgtgatct acacagatgc tctacagacc gtcattcatg tagggggagc actggctctc 660
atgttcttgg gttttcaaga ggtgggctgg taccagggc tgcagcagct atataagcaa 720
gccattccca acgtcacagt tcccaacacc acttgtcacc tcccacggcc tgatgccttc 780
cacatgcttc gtgatcctgt gaatggggac atcccatggc caggtttaat ttttggactc 840
acagtcctgg caacctgggtg ttgggtgcaca gaccaggtga ttgtgcagag gtctctctcc 900
gccaaagatc tttcccatgc caaggggggc tcagtgtgag gaggtacat aaaaatcctc 960
ccaatgttct tcattgtcat gcctggcatg atcagccggg ctctgtacct agatgaagtt 1020
gcctgtgtaa accctgacat ctgtcaaaga gtgtgtgggg ccagagtggg atgctccaac 1080
attgcctacc caaagctgat catggctctc atgccctgg gtctaagggg tctgatgatc 1140
gctgtgatca tggctgccct gatgagctca ctcacctca tcttcaacag cagtagcacc 1200
ctatttgtca tagatgtgtg gcagcgcttc cgcaagcagg caacggaaca agagttgatg 1260
gtggtaggca ggttgttcat agtcttctca gtagtcatca gcatcctctg gatccccatc 1320
atccagagct ccaacagtgg gcagctcttt gactacatcc aatctatcac cagctaccta 1380
gccccacca tcacagccct cttcctgctg gccatcttca gcaaaagggt cactgagcct 1440
ggtgccttct ggggcctcac tttgggccta gcagtgggaa tagtgcgcat gatccttgaa 1500
ttctcatatc ctgccccagc ctgtggggag atggacagga ggctgtgtgt cctgagagac 1560
gtccactacc tgtattttgc cctcctctc tgtggacttt ctgccatcat cactgtcata 1620
atcagtttct gcacagagcc catccctgat gaaaagcttg ctgccttgac ctgggtggacg 1680

32/37

aggaactgcc ccttacctga agtggagaag agagcctctg tgagtgggga catggagggg 1740
 gaaaacactc cagggtctgc agggacacca gctgtggagg gccctcagg agatggagaa 1800
 gaagcaagac ccaccaggg gcctgaaaaa ccaagagccc agcataggtc ttgggggaaa 1860
 tggctgtgga gctggttctg cggactctca ggggccccac agcaagccct gagcgcagct 1920
 gagaaggctg cattggagaa gaagctgacc agcatcgagg aggagcccct ctggagacat 1980
 gtctgcaaca tcaatgccat catcctgctg gccatcaaca tctttctctg gggctatattt 2040
 gcgtga 2046

<210> 52

<211> 657

<212> PRT

<213> Hamster

<400> 52

Met Asp Ser Ser Thr Leu Ser Pro Ala Val Thr Ala Thr Asp Ser Pro

5

10

15

Ile Pro Ser Tyr Glu Arg Ile Arg Asn Ala Ala Asp Ile Ser Val Ile

20

25

30

Val Ile Tyr Phe Val Val Val Met Ala Val Gly Leu Trp Ala Met Phe

35

40

45

Ser Thr Asn Arg Gly Thr Val Gly Gly Phe Phe Leu Ala Gly Arg Ser

50

55

60

Met Val Trp Trp Pro Ile Gly Ala Ser Leu Phe Ala Ser Asn Ile Gly

65

70

75

80

Ser Gly His Phe Val Gly Leu Ala Gly Thr Gly Ala Ala Ser Gly Ile

85

90

95

Ala Met Gly Gly Phe Glu Trp Asn Ala Leu Ile Phe Val Val Val Leu

100

105

110

Gly Trp Ile Phe Val Pro Ile Tyr Ile Arg Ala Gly Val Val Thr Met

115

120

125

Pro Glu Tyr Leu Arg Lys Arg Phe Gly Gly Lys Arg Ile Gln Ile Tyr
130 135 140
Leu Ser Ile Leu Ser Leu Leu Leu Tyr Ile Phe Thr Lys Ile Ser Ala
145 150 155 160
Asp Ile Phe Ser Gly Ala Ile Phe Ile Asn Leu Ala Leu Gly Leu Asp
165 170 175
Ile Tyr Leu Ala Ile Phe Ile Leu Leu Ala Ile Thr Ala Leu Tyr Thr
180 185 190
Ile Thr Gly Gly Leu Ala Ala Val Ile Tyr Thr Asp Ala Leu Gln Thr
195 200 205
Ala Ile Met Leu Val Gly Ser Ile Ile Leu Thr Ala Phe Ala Phe Asn
210 215 220
Glu Val Gly Gly Tyr Glu Ala Phe Val Glu Lys Tyr Met Lys Ala Ile
225 230 235 240
Pro Ser Met Ile Ser Asp Gly Asn Leu Thr Ile Lys Glu Glu Cys Tyr
245 250 255
Thr Pro Lys Glu Asp Ser Phe His Ile Phe Arg Asp Pro Ile Lys Gly
260 265 270
Asp Ile Pro Trp Pro Gly Leu Ile Phe Gly Leu Ser Ile Leu Ala Leu
275 280 285
Trp Tyr Trp Cys Thr Asp Gln Val Ile Val Gln Arg Cys Leu Ser Ala
290 295 300
Lys Asn Met Ser His Val Lys Ala Gly Cys Thr Leu Cys Gly Tyr Leu
305 310 315 320
Met Val Met Thr Gly Met Val Ser Arg Ile Leu Tyr Thr Asp Lys Ile
325 330 335
Ala Cys Val Val Pro Ser Glu Cys Lys Lys Tyr Cys Gly Thr Ser Val
340 345 350

34/37

Gly Cys Thr Asn Ile Ala Tyr Pro Thr Leu Val Val Glu Leu Met Pro
355 360 365
Asp Gly Leu Arg Gly Leu Met Leu Ser Val Met Met Ala Ser Leu Met
370 375 380
Ser Ser Leu Thr Ser Ile Phe Asn Ser Ala Ser Thr Leu Phe Thr Met
385 390 395 400
Asp Ile Tyr Thr Lys Ile Arg Lys Arg Ala Ser Glu Arg Glu Leu Met
405 410 415
Ile Ala Gly Arg Leu Phe Met Leu Leu Leu Ile Ala Ile Ser Ile Ala
420 425 430
Trp Val Pro Ile Val Gln Ser Ala Gln Ser Gly Gln Leu Phe Asp Tyr
435 440 445
Ile Gln Ser Ile Thr Ser Tyr Leu Gly Pro Pro Ile Gly Ala Val Phe
450 455 460
Leu Leu Ala Ile Phe Cys Lys Arg Val Asn Glu Gln Gly Ala Phe Trp
465 470 475 480
Gly Leu Ile Leu Gly Phe Phe Ile Gly Val Ala Arg Met Ile Thr Glu
485 490 495
Phe Ala Tyr Gly Thr Gly Ser Cys Met Glu Pro Ser Asn Cys Pro Thr
500 505 510
Ile Ile Cys Gly Val His Tyr Leu Tyr Phe Ala Ile Ile Leu Phe Val
515 520 525
Ile Cys Val Ile Thr Ile Leu Thr Val Ser Phe Leu Thr Lys Pro Ile
530 535 540
Pro Asp Val His Leu Tyr Arg Leu Cys Trp Ser Leu Arg Asn Ser Lys
545 550 555 560
Glu Glu Arg Ile Asp Leu Asp Ala Gly Asp Glu Glu Thr Trp Glu Asp
565 570 575

35/37

Ser Lys Asp Thr Ile Glu Ile Asp Thr Glu Ala Pro Gln Lys Glu Lys

580

585

590

Gly Cys Phe Arg Arg Ala Tyr Asp Met Phe Cys Gly Leu Asp Gln Asp

595

600

605

Lys Gly Pro Lys Met Thr Lys Glu Glu Glu Glu Ala Met Lys Leu Lys

610

615

620

Met Thr Asp Thr Ser Glu Gln Pro Leu Trp Arg Thr Val Val Asn Ile

625

630

635

640

Asn Gly Ile Ile Leu Leu Ala Val Ala Val Phe Cys His Gly Tyr Phe

645

650

655

Ala

<210> 53

<211> 1974

<212> DNA

<213> Hamster

<400> 53

```

atggacagta gcaccttgag ccccgcggtc acggccacag attcaccat cccgtcttat    60
gaacgcattc gcaatgctgc tgacatctca gtcattgtca tctacttcgt ggtggtgatg    120
gctgtcgggc tgtgggggat gttttccact aatcgtggga ctgttggagg cttcttcctc    180
gcaggccgaa gtatggtgtg gtggccaatt ggagcctctc tctttgccag taacattgga    240
agcggtcact ttgtgggact ggcagggacg ggagcagcct caggcattgc catgggtggc    300
tttgaatgga atgccttgat tttcgtggtg gtgctgggct ggatattcgt ccctatttac    360
atcagggctg ggggtggtgac gatgccggag tatctacgga agcggtttgg aggcaagcga    420
atccagatct acctttccat tctgtccttg ttgctttaca tttttaccaa gatctcagca    480
gacatcttct ctggagctat atttatcaat ctagccttgg gtctggatat atacttggcc    540
atctttatcc tactagcaat cactgccctt tatacaatca cagggggcct ggcagcggtg    600
atctacacag atgccttgca gaccgcaatc atgctggtgg ggtctattat cctgaccgca    660
tttgccttca atgaagtagg agggatatgag gcatttgttg agaagtacat gaaagccatt    720

```


ccaagtatga tttctgatgg aaatctgacc atcaaggaag aatgttacac tcccaaggag 780
gactcgttcc atatattccg agatcctatt aaggagagaca ttccatggcc tgggctcatc 840
tttggcctgt ccatcctcgc cctgtggtac tgggtgcacag accaggatcat cgtgcagcgc 900
tgccctctcag ctaagaacat gtctcacgtg aaggccggct gtaccctgtg cggctatctg 960
atggtgatga cggaatggt cagccggatt ctgtacacag aaaaatcgc ctgtgtcgtc 1020
ccctcggaat gtaagaaata ctgtggtacc tcagttggct gcaccaacat tgcctatcca 1080
accttggtgg tggagctcat gcctgatgga cttcgaggcc tgatgttgtc agtcatgatg 1140
gcctcactca tgagctcttt gacctccatc ttcaacagcg ccagcacctt ctttaccatg 1200
gacatctaca ccaagatccg gaagagagca tctgagaggg agtcatgatg tgcaggaagg 1260
ttgttcatgc tctgtctgat tgccatcagc atcgctggg tgcccatcgt gcagtcggct 1320
caaagtggac agctctttga ttacatccag tctatcacca gctacttggg gccacccatt 1380
ggggctgtct tctgtctggc tattttctgc aagagagtca atgaacaagg agccttctgg 1440
ggactgatcc taggcttctt tattgggggc gccgctatga tcaccgagtt tgcctatgga 1500
actgggagct gcatggagcc cagcaactgc cccacgatca tctgtggggc ccactatttg 1560
tactttgcca tcatcctctt tggtatctgt gtaatcacca tcttgaccgt ctccttcctc 1620
accaagccca ttccagatgt gcacctgtac cgtctgtgtt ggagtctacg caacagcaaa 1680
gaagaacgga tcgacctgga tgccggagat gaggaacct gggaagactc taaggacaca 1740
attgagatag acacagaggc tccccaaaag gagaaaggat gtttcaggag ggcatatgac 1800
atgttctgtg gcctcgacca ggacaaagga ccaagatga ctaaggaaga ggaggaagcc 1860
atgaagctga agatgacaga cacatctgag cagcctttgt ggaggacggt ggtaaaccatc 1920
aatggcatca tctgtttggc tgtggctgtc ttttgccacg gatattttgc ttga 1974

<210> 54

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 54

gcaatggagc ctggagattc ag

22

<210> 55

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 55

agcctgcctc tggctcttg

18

<210> 56

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 56

atggacagta gcaccttgag ccccgcggtc a

31

<210> 57

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 57

gattcaagca aaatatccgt ggcaaaaga

29

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP03/13782

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K45/00, 31/7088, 38/17, 48/00, A61P3/04, 3/06, 3/10,
G01N33/566, 33/50, 33/15//C12N15/12, C12Q1/02, 1/68,
C07K14/47, 16/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K45/00, 31/7088, 38/17, 48/00, A61P3/04, 3/06, 3/10,
G01N33/566, 33/50, 33/15//C12N15/12, C12Q1/02, 1/68,
C07K14/47, 16/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN), REGISTRY (STN),
JICST (JOIS), SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/053738 A1 (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 11 July, 2002 (11.07.02), In particular, abstract; Claims; page 2, lines 20 to 24 & JP 2003-079381 A & EP 1357186 A1	1-27, 42-48
X	RONGIONE, Anthony J. et al., EGF and TGF stimulate proabsorption of glucose and electrolytes by Na ⁺ /glucose cotransporter in awake canine model, Digestive Diseases and Sciences, 2001, Vol.46, No.8, pages 1740 to 1747; in particular, abstract	1-27, 42-48

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
22 January, 2004 (22.01.04)

Date of mailing of the international search report
03 February, 2004 (03.02.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP03/13782

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KLAREN, P.H.M. et al., Effect of loperamide on Na ⁺ /D-glucose cotransporter activity in mouse small intestine., Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2000, Vol.52, No.6, pages 679 to 686; in particular, abstract	1-27,42-48
X	SHIMIZU, Makoto et al., Regulation of intestinal glucose transport by tea catechins, BioFactors, 2000, Vol.13, No.1-4, pages 61 to 65; in particular, abstract	1-27,42-48
X	BOSC, L.V. Gonzalez et al., Effect of atrial natriuretic peptide on α -methyl-D-glucoside intestinal active uptake in rats, Peptides, 1998, Vol.19, No.7, pages 1249 to 1253; in particular, abstract	1-27,42-48
X	TURNER, J.R. et al., Carboxyl-terminal vesicular stomatitis virus G protein-tagged intestinal Na ⁺ -dependent glucose cotransporter (SGLT1). Maintenance of surface expression and global transport function with selective perturbation of transport kinetics and polarized expression., Journal of Biological Chemistry, 1996, Vol.271, No.13, pages 7738 to 7744; in particular, abstract	1-27,42-48
A	WO 01/75067 A2 (HYSEQ, INC.), 11 October, 2001 (11.10.01), & WO 01/75067 A2 & WO 01/75067 A3 & WO 01/75067 C2	1-27,42-48
A	WO 01/92304 A2 (INCYTEGENOMICS, INC.), 06 December, 2001 (06.12.01), & WO 01/92304 A3 & EP 1320548 A2 & US 2003/216310 A1	1-27,42-48
A	WO 02/04520 A2 (INCYTEGENOMICS, INC.), 17 January, 2002 (17.01.02), & WO 02/04520 A3 & EP 1313854 A2	1-27,42-48
A	WO 02/10216 A2 (CURAGEN CORP.), 07 February, 2002 (07.02.02), & WO 02/10216 A3 & US 2003/064369 A1 & EP 1326971 A2	1-27,42-48

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP03/13782

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 28 to 41

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 28 to 41 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ A61K45/00, 31/7088, 38/17, 48/00, A61P3/04, 3/06, 3/10, G01N33/566, 33/50, 33/15 // C12N15/12, C12Q1/02, 1/68, C07K14/47, 16/18

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ A61K45/00; 31/7088, 38/17, 48/00, A61P3/04, 3/06, 3/10, G01N33/566, 33/50, 33/15 // C12N15/12, C12Q1/02, 1/68, C07K14/47, 16/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS(STN), MEDLINE(STN), EMBASE(STN), BIOSIS(STN), REGISTRY(STN), JICST(JOIS), SwissProt/PIR/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 02/053738 A1(武田薬品工業株式会社)2002.07.11 特に、Abstract, 請求の範囲, 第2 ^{ページ} 第20-24行 & JP 2003-079381 A & EP 1357186 A1	1-27, 42-48
X	RONGIONE, Anthony J. et al., EGF and TGF stimulate proabsorption of glucose and electrolytes by Na ⁺ /glucose cotransporter in awake canine model, Digestive Diseases and Sciences, 2001, Vol.46, No.8, pp.1740-1747 特に、Abstract	1-27, 42-48

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22. 01. 04

国際調査報告の発送日

03. 2. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

浅田 浩吉 印

4 C

9 8 4 1

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	KLAREN, P.H.M. et al., Effect of loperamide on Na ⁺ /D-glucose cotransporter activity in mouse small intestine., Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2000, Vol.52, No.6, pp.679-686 特に、Abstract	1-27, 42-48
X	SHIMIZU, Makoto et al., Regulation of intestinal glucose transport by tea catechins, BioFactors, 2000, Vol.13, No.1-4, pp.61-65 特に、Abstract	1-27, 42-48
X	BOSC, L. V. Gonzalez et al., Effect of atrial natriuretic peptide on α -methyl-D-glucoside intestinal active uptake in rats, Peptides, 1998, Vol.19, No.7, pp.1249-1253 特に、Abstract	1-27, 42-48
X	TURNER, J. R. et al., Carboxyl-terminal vesicular stomatitis virus G protein-tagged intestinal Na ⁺ -dependent glucose cotransporter (SGLT1). Maintenance of surface expression and global transport function with selective perturbation of transport kinetics and polarized expression., Journal of Biological Chemistry, 1996, Vol.271, No.13, pp.7738-7744 特に、Abstract	1-27, 42-48
A	WO 01/75067 A2(HYSEQ, INC.)2001.10.11 & WO 01/75067 A2 & WO 01/75067 A3 & WO 01/75067 C2	1-27, 42-48
A	WO 01/92304 A2(ENCYTEGENOMICS, INC.)2001.12.06 & WO 01/92304 A3 & EP 1320548 A2 & US 2003/216310 A1	1-27, 42-48
A	WO 02/04520 A2(ENCYTEGENOMICS, INC.)2002.01.17 & WO 02/04520 A3 & EP 1313854 A2	1-27, 42-48
A	WO 02/10216 A2(CURAGEN CORPORATION)2002.02.07 & WO 02/10216 A3 & US 2003/064369 A1 & EP 1326971 A2	1-27, 42-48

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (P C T 1 7 条 (2) (a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 2 8 - 4 1 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲 2 8 - 4 1 は治療による人体の処置方法に関するものであって、P C T 1 7 条 (2) (a) (i) 及び P C T 規則 39. 1 (iv) の規定により、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって P C T 規則 6. 4 (a) の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。